

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Au-Nanossondas
Aplicação na detecção de *Mycobacterium*
tuberculosis* e *Plasmodium berghei

Bruno Miguel Ribeiro Veigas

Dissertação apresentada na Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade
Nova de Lisboa para a obtenção do grau
de Mestre em Biotecnologia.

Orientador Científico: Prof. Doutor Pedro Viana Baptista

Lisboa
2009

Agradecimentos

À coordenação do mestrado em Biotecnologia 2007/2009 da FCT/UNL e a todo o corpo docente, pela disponibilidade e empenho demonstrado, resultando numa formação de excelência.

Ao Departamento de Ciências da Vida (DCV), mais especificamente ao Centro de Investigação em Genética Molecular Humana (CIGMH) da UNL, pelas excelentes condições de trabalho proporcionadas no desenvolvimento do presente projecto de investigação. Especial agradecimento ao Prof. Doutor Pedro Viana Baptista pela oportunidade e óptima orientação científica, bem como pela confiança, ajuda, paciência e amizade.

Gostaria de agradecer aos colegas de laboratório do CIGMH, e restantes laboratórios do DCV e do DQ, que de diversas formas me ajudaram durante este período.

À minha família e a todos os meus amigos, pelo apoio, pela amizade e pelos momentos de lazer.

Dedico esta dissertação a todos aqueles que estiveram ao meu lado e acima de tudo acreditaram que eu era capaz de a concretizar, a todos vocês, muito obrigado.

Resumo

A presente tese apresenta a caracterização de um sistema de Nanossondas de Ouro quanto à sua estabilidade, sensibilidade e especificidade, na detecção de alvos de DNA em amostras controle e biológicas.

Foram analisados factores envolvidos na modelação das propriedades deste sistema, nomeadamente a extensão de funcionalização, o tamanho da sequência dos oligonucleótidos sonda, entre outros. Foram desenvolvidas duas sondas: PlasmBerg e MTub, específicas para *Plasmodium berghei* e *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente. O sistema obtido permite a quantificação semi-quantitativa de DNA, com limites de detecção de 13 µg/mL e de 20 µg/mL para as sondas PlasmBerg e MTub respectivamente. Este sistema demonstrou um elevado nível de especificidade, possibilitando a diferenciação entre alvos totalmente complementares de alvos com *mismatch*.

Optimizou-se o sistema de Au-nanossondas para a detecção de mutações pontuais presentes nos codões 516 e 531 do gene *rpoB* de *M. tuberculosis*, associados à resistência a antibióticos. Verificou-se que o sistema discrimina entre sequências complementares e sequências com mutações pontuais, possibilitando também a discriminação entre *M. tuberculosis* e *M. kansasii*.

Validou-se o sistema desenvolvido com a sonda MTub recorrendo a 144 amostras biológicas previamente analisadas por quatro métodos padrão. Verificou-se que apenas 1,2% (1/83) dos resultados Negativo não apresentam qualquer correlação com os testes padrão.

Abstract

In the present work was evaluated the stability, sensitivity and specificity of Au-nanoprobes, in DNA detection. It was analyzed factors involved in modeling the properties of this system, including the extent of functionalization, the size of the sequence of oligonucleotide probe, among others. Two probes were developed: PlasmBerg and MTub, specific for *Plasmodium berghei* and *Mycobacterium tuberculosis* respectively. The methodology allows semi-quantitative measurement of DNA, with detection limits of 13 µg/mL and 20 µg/mL for the probes PlasmBerg and MTub respectively. This system demonstrates a high level of specificity, enabling differentiation between full complementary targets from target with mismatch.

The methodology was optimized for detecting single nucleotide mutations. Specific probes were synthesized for the detection of polymorphisms at codon 516 and 531 of the *rpoB* gene of *M. tuberculosis*, associated with antibiotic resistance. The results show that this system discriminates full complementary sequences from sequences with single nucleotide mutations, also enabling the discrimination between *M. tuberculosis* and *M. kansasii*.

The methodology was validated by testing the probe MTub (specific for *M. tuberculosis*) with 144 biological samples, previously analyzed by four standard methods. Only 1.2% (1/83) of Negative results show no correlation with at least one of the standard tests.

Abreviaturas

Abs.	Absorvância
Amp	Ampicilina
AuNPs	Nanopartículas de ouro
bp	Pares de bases
DNA	Deoxyribonucleic acid; em português (Ácido desoxirribonucleico - ADN)
DNAp	DNA plasmídico
dNTPs	Nucleótidos (solução de)
dsDNA	DNA em cadeia dupla
DTT	Ditiotreitol
LB	Luria Bertani
LB/Amp	Luria Bertani, contendo ampicilina (100 µg/ml)
NPs	Nanopartículas
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
ssDNA	DNA em cadeia simples
TB	Tuberculose
UV	Ultra-violeta
Vis	Visível

Índice Geral

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	5
Abreviaturas.....	6
1. Introdução	10
1.1 Bionanotecnologia	10
1.2 Nanopartículas de ouro	11
1.2.1 Propriedades físicas	11
1.2.1.1 Propriedades ópticas	12
1.3 Nanossondas de Ouro.....	13
1.3.1 Metodologia <i>crosslinking</i> e <i>non-crosslinking</i>	14
1.4 Tuberculose - etiologia e perspectiva em nanodiagnóstico	14
1.5 <i>Plasmodium sp</i>.....	16
1.6 Objectivos	17
2. Materiais e Métodos	18
2.1 Reagentes	18
2.1.1 Oligonucleótidos de DNA.....	19
2.2 DNA <i>template</i>/alvo	19
Clones <i>template</i> : <i>pMTUB</i> , <i>pRpoWT</i> , <i>pRpoA516V</i> , <i>pRpoS531L</i> , <i>pMKA</i> e <i>pANKA</i>	19
2.3 Meios de Cultura	20
2.4 Soluções	20
2.5 Equipamento	21
2.6 Métodos Gerais	22
2.6.1 Preparação de alvos.....	22
2.6.1.1 Extracção de DNA plasmídico	22
2.6.1.2 Amplificação de ácidos nucleicos por PCR	23
2.6.1.3 Fragmentação de ácidos nucleicos com sono-reactor	24
2.6.2 Preparação de Sondas	24
2.6.2.1 Síntese de AuNPs	24
2.6.2.2 Desenho da sequência dos oligonucleótidos	24
2.6.2.3 Tratamento do oligonucleótido funcionalizado	25
2.6.2.4 Síntese de Au-nanossonda	25

2.6.3 Ensaio colorimétrico	26
3. Resultados e Discussão	27
3.1 Síntese e caracterização de nanossondas	27
3.1.1 Estabilidade do ouro coloidal	27
3.1.2 Análise de sequências	29
3.2 Caracterização das Au-nanossondas	31
3.2.1 Efeito da razão oligo/partícula na estabilidade de sondas	32
3.2.2 Efeito da utilização de ultra-sons durante a síntese de sondas	33
3.2.3 Análise da extensão de funcionalização:	33
3.3 Detecção de DNA	35
3.3.1 Funcionalização de sonda	35
3.3.2 Efeito do material biológico	37
3.4 Optimização de Au-nanossondas	40
3.4.1 Detecção de <i>Plasmodium berghei</i>	40
3.4.2 Detecção de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	43
3.4.2.1 Quantificação de DNA alvo	43
3.4.3 Detecção de mutações pontuais associadas a resistência a antibióticos	46
3.6 Validação do sistema de nanossondas	50
4. Conclusão e perspectivas futuras	52
5. Bibliografia	54
Anexos:	62
Anexo A: Sequência de clones template	62
Anexo B: Fragmentação de plasmídeos por ultra-sons:	64
Anexo C: Testes de <i>spiking</i> sonda PlasmBerg	65
Anexo D: Testes de <i>spiking</i> sonda MTub	66
Anexo E: Testes de amostras biológicas para a presença de <i>M. tuberculosis</i> com quatro métodos de diagnóstico	67
Anexo F: Correlação entre os resultados obtidos com a metodologia Au-nanossondas e quatro testes padrão na detecção de <i>M. tuberculosis</i>	70

Índice de Figuras

Figura 1: Espectros de absorvância de Au-nanopartículas.....	27
Figura 2: Análise das sequências do gene <i>rpoB</i> de <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. Kansasii</i>	30
Figura 3: Análise da sequências do gene rRNA 18S de <i>P. berghei</i>	30
Figura 4: Electroforese de Au-nanossondas	34
Figura 5: Teste colorimétrico da sonda MTub com diferentes alvos.	38
Figura 6: Teste colorimétrico da sonda MTub com Plasmídeos	39
Figura 7: Quantificação de DNA alvo com a sonda PlasmBerg	41
Figura 8: Especificidade de Au-nanossondas: detecção de mutações <i>frameshift</i>	42
Figura 9: Quantificação de DNA alvo com sonda MTub	43
Figura 10: Especificidade de Au-nanossondas: discriminação <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. Kansasii</i>	45
Figura 11: Cinética de agregação de Au-nanossondas em função da força iônica	46
Figura 12: Cinética de agregação de Au-nanossondas na presença de diferentes alvos.	47
Figura 13: Detecção de mutações que conferem resistência a antibióticos; Sondas Rpo516.....	48
Figura 14: Detecção de mutações que conferem resistência a antibióticos; Sondas Rpo531.....	49
Figura 15: Comparação entre métodos de detecção de <i>M. Tuberculosis</i>	51
Figura 16: Electroforese do DNA <i>template</i> e produtos de PCR	63
Figura 17: Electroforese do DNA <i>template</i> e produtos de PCR	64
Figura 18: Electroforese de plasmídeos fragmentados.....	65

Índice de tabelas

Tabela 1: Efeito da força iônica na síntese de sonda.....	31
Tabela 2: Efeito da razão Oligo/NPs e utilização de ultra-sons na estabilidade de sondas.....	32
Tabela 3: Efeito da razão Oligo/NPs e utilização de ultra-sons na capacidade de detecção	35

1. Introdução

O interesse em diagnosticar doenças ou condições médicas numa fase precoce tem vindo a aumentar, obrigando ao emprego de novas tecnologias para diminuir o tempo de diagnóstico, o que possibilita uma terapêutica rápida e eficaz. Tem-se assistido ao aparecimento de novas abordagens no desenvolvimento de sistemas complementares de diagnóstico. Entre estas novas tecnologias, os sistemas nanotecnológicos têm possibilitado o desenvolvimento de novas metodologias, com elevada sensibilidade e especificidade, a baixo custo. No presente trabalho foi desenvolvido um sistema nanotecnológico para a detecção de agentes infecciosos.

1.1 Bionanotecnologia

Em 1959, Richard Feynman mencionou pela primeira vez a manipulação de matéria à nano escala, apresentando a possibilidade de utilização de unidades atómicas como blocos para construção ao nível molecular [1,2].

Na definição actual a bionanotecnologia envolve a engenharia de sistemas à nanoescala para aplicações biotecnológicas. Estes sistemas apresentam dimensões da ordem dos nanómetros (<500nm), onde fenómenos únicos consequentes desta característica permitem novas aplicações [1,2]. Mais recentemente, Mirkin e colaboradores têm sido pioneiros em modificações químicas de nano-sistemas, principalmente na criação de novos ligandos, e nanopartículas (NPs), interacção com dispositivos electrónicos e criação de novos materiais baseados em sistemas de nanopartícula-DNA [3-6].

De todos os sistemas nanotecnológicos, os sistemas de NPs têm adquirido grande relevância em vários campos científicos. Estas partículas apresentam propriedades físicas e ópticas muito específicas, dependentes do seu tamanho [3]. O elevadíssimo ratio de área por unidade de volume que estas partículas apresentam possibilita uma grande capacidade de carga à sua superfície. Estes sistemas estão a emergir como a próxima era de sondas biológicas, no que respeita à área do diagnóstico. As nanopartículas apresentam uma razão sinal/ruído bastante elevada e são bastante resistentes à fotodegradação [6], quando comparados com os fluoróforos utilizados

actualmente, podendo ser utilizadas em monitorização de fenómenos biológicos de longa duração [7].

1.2 Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro são encontradas em artefactos antigos que remontam ao século V a.C. [8,9]. Em 1857 Faraday desenvolveu novos métodos de síntese para nanopartículas de ouro coloidal (AuNP) [10]. Um grande número de métodos de síntese de AuNP foi descrito por redução de sais de ouro com uma grande variedade de agentes redutores orgânicos [11], cujas partículas resultantes apresentavam uma estabilidade reduzida, dificultando assim a sua posterior aplicação. A estabilidade destas partículas foi conseguida pelo uso de agentes tiolados. Estes compostos ligam-se espontaneamente a superfícies de ouro conferindo um acréscimo de estabilidade.

O método mais popular nos dias de hoje é baseado nos métodos apresentados por Turkevich, descrito pela primeira vez em 1940, que apresenta um grande controlo no tamanho das AuNPs sintetizadas, entre 10 e 40 nm, com uma baixa dispersão de tamanho. Neste método recorre-se à redução do Au (III) por iões de Citrato [9,12]. AuNPs estabilizados por citrato são materiais precursores para as mais variadas aplicações [13,14], quando utilizada a metodologia de síntese em duas fases [15,16], desenvolvida por Schiffrin *et al.* 1994. Na primeira fase recorre-se a um agente redutor orgânico, formando AuNPs relativamente estáveis em água, e na segunda fase este revestimento é substituído por compostos tiolados [17,18]. O processo possibilita a síntese de partículas susceptíveis de serem funcionalizadas com diferentes ligandos sendo a escolha dos ligandos independente do processo de síntese [19,20]. A importância de modificar a superfície das NPs reside na possibilidade de modelar as características dependentes do tamanho que estas partículas apresentam, assim como as características intrínsecas da sua superfície.

1.2.1 Propriedades Físicas

A característica física mais relevante das NPs é a sua dimensão. As propriedades como área específica de superfície, viscosidade e comportamento de agregação que apresentam interesse biotecnológico, são influenciadas pelo seu tamanho [21].

Um factor importante a ter em consideração é a complexidade destes sistemas, já que poderão adquirir um grande número de formas e tamanhos, o que dificulta a compreensão do seu comportamento. Mesmo no caso mais simples de partículas esféricas monodispersas, poderá existir carga não uniforme à superfície da partícula devido à heterogeneidade da superfície ao nível atómico.

A estabilidade das NPs, relativamente a fenómenos como agregação e adesão é dependente das forças presentes à sua superfície. Estas forças variam com as condições físicas e químicas do meio em que se encontram. A agregação é o processo pelo qual duas ou mais partículas se agrupam (agregado), mas não se fundem numa partícula única. O termo estabilidade em NPs representa a estabilidade cinética, e define-se assim como a capacidade de partículas coloidais permanecerem uniformemente distribuídas na amostra. Esta propriedade pode ser modelada pela adição de compostos que interagem física ou quimicamente com cada uma das partículas do sistema. Estas partículas encontram-se estabilizadas por uma camada de iões à superfície que mantém uma carga fixa e do mesmo sinal, promovendo a repulsão electrostática e mantendo-as afastadas (cineticamente estáveis). No entanto, por adição de um electrólito e consequente aumento de força iónica no meio, a repulsão electrostática entre as partículas é atenuada, e a suspensão coloidal passa a ser cineticamente instável, originando a agregação.

1.2.1.1 Propriedades ópticas

Gustav Mie fez a primeira previsão teórica rigorosa para as propriedades ópticas de partículas esféricas [22,23], conseguindo calcular o coeficiente de extinção molar para AuNPs. A sua teoria baseada nas equações de Maxwell determina a dependência do tamanho e forma destes agregados de átomos na interacção com o campo electromagnético da luz incidente, explicando os efeitos de dispersão e absorção de luz por AuNPs com tamanhos inferiores a comprimentos de onda incidentes. A observação mais relevante em NPs metálicas é a presença de uma forte banda na região do visível associada à ressonância de plasmónica (Surface Plasmon Resonance; SPR), o que proporciona cores vivas a estas suspensões.

Enquanto os espectros de moléculas podem ser explicadas em termos de mecânica quântica, a SPR destes sistemas de NPs é explicada através da teoria de electrões livres, modelos de sistemas electrostáticos e polarização de partículas [24]. O diâmetro das NPs é da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda da radiação electromagnética incidente fazendo com que o campo magnético da luz movimente colectivamente os electrões condutores, induzindo dipolos instantâneos. Esta oscilação forma um dipolo oscilante efectivo que anula a radiação electromagnética incidente com a mesma frequência, verificando-se assim uma “pseudo-absorção de luz”. A frequência de ressonância depende da separação das cargas opostas à superfície, que é função do tamanho, geometria da partícula e da polarização do meio [25,26]. Nestes sistemas pode-se manter a composição de uma partícula constante e obter variações no coeficiente de extinção molar máximo em dezenas de nanómetros, apenas pela alteração da forma das partículas. A agregação das partículas provoca um alargamento da banda da SPR devido ao aumento do coeficiente de extinção molar para comprimentos de onda mais elevados (600–800 nm) [27].

1.3 Nanossondas de Ouro

Existe um interesse crescente em desenvolver técnicas de análise e detecção de DNA por imobilização em suportes sólidos, nas mais variadas áreas da biotecnologia e em particular para a detecção de sequências específicas de DNA. As nanossondas de Ouro (Au-nanossondas) são a fusão de duas tecnologias. Por um lado temos a síntese de AuNPs, pelo método de redução por citrato [28], evidenciando todas as suas propriedades físicas e ópticas bem conhecidas. Por outro, temos a tecnologia de funcionalização de superfícies de ouro com oligonucleótidos tiolados, descrita por Storhoff *et al.* [3]. A fusão destas duas metodologias permite a utilização das NPs em sistemas de detecção de ácidos nucleicos. Estes sistemas apresentam-se como uma alternativa aos métodos de hibridação em suportes sólidos, sem contudo recorrer a passos de lavagens ou à utilização de fluoróforos, se bem que apresentando por vezes uma sensibilidade mais baixa [29].

1.3.1 Metodologia *crosslinking* e *non-crosslinking*

O desenvolvimento de sistemas para detecção colorimétrica de DNA baseado em AuNPs foi introduzido por Mirkin e co-investigadores [5]. A metodologia desenvolvida por este grupo ficou conhecida como sistema *crosslinking*. Nesta abordagem são utilizadas duas populações de Au-nanossondas com sequências complementares a regiões adjacentes ao alvo de interesse, em que a AuNP se encontram ligada à extremidade 5' de uma sequência e a 3' na outra. Ao promover a hibridação dos alvos com as sondas, promove-se também a sua aproximação, resultando assim na alteração de cor da suspensão [4,30-32].

Posteriormente, surgiram outras abordagens que recorrem apenas a uma população de Au-nanossondas com uma única sequência de DNA. O fenómeno de agregação não resulta da hibridação dos alvos com a sonda, mas sim pela indução do aumento da força iónica do meio após adição de electrólito - método *non-cross-linking*. A hibridação de alvos com a nanossonda aumenta a sua estabilidade, impedindo a sua agregação [32-37]. O método de *non-crosslinking* tem sido desenvolvido de forma a aumentar a sensibilidade e especificidade, tendo já sido aplicado com sucesso na detecção de mutações pontuais [35], na caracterização da expressão génica sem passos de transcrição reversa e/ou amplificação por PCR [33] e no desenvolvimento de um sistema de diagnóstico para a detecção de *Mycobacterium tuberculosis* [38].

1.4 Tuberculose - etiologia e perspectiva em nanodiagnóstico

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa responsável por mais de 2 milhões de mortes e de 8 milhões de novos casos todos os anos [38]. Os relatórios da Organização Mundial de Saúde demonstram taxas de incidência mais elevadas das que o estimado, e cerca de 20% dos casos de infecção primária já apresentam ser resistentes a vários antibióticos, isto é, resistentes a rifampicina e a isoniazida, os dois fármacos mais eficazes [39,40]. A Organização Mundial de Saúde estima que 50 milhões de pessoas estão infectadas com estirpes resistentes a pelo menos um dos fármacos mais utilizados na terapia desta doença [41-43].

M. tuberculosis adquire resistência a antibióticos por selecção de mutações pontuais

que ocorrem aleatoriamente. Cada uma destas alterações confere resistência a um fármaco específico e a acumulação destas mutações pode levar a estirpes multi-resistentes. A resistência à rifampicina é adquirida por mutações pontuais numa região de 81 bp (codões 507–533, *Cluster I*) da subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*). As mutações nesta zona são responsáveis por 95% dos isolados resistentes a este fármaco, em que as mutações mais frequentes são alterações nos codões 516, 526 e 531 [44,45]. A resistência a este fármaco apresenta-se como um marcador indirecto de multiresistência já que 90% das estirpes resistentes a este fármaco são também resistentes a isoniazida [46,47].

O diagnóstico laboratorial de *M. tuberculosis* é efectuado por meios padrão *Acid-fast bacillus* (AFB – coloração de Ziehl Neelsen) e *Lowenstein-Jensen* (LJ), no entanto este microrganismo apresenta taxas de crescimento muito baixas, o que provoca a demora do diagnóstico [48-53]. Devido ao desenvolvimento de metodologias de diagnóstico molecular, começaram a surgir diferentes abordagens na detecção e identificação desta bactéria resultando em *kits* de diagnóstico [54,55]. Existem dois testes aprovados e em utilização para o diagnóstico de *M. tuberculosis*, como por exemplo: *Enhanced Mycobacterium tuberculosis Direct Test (E-MTD; Gen-Probe, San Diego, CA)* e o *Amplicor Mycobacterium tuberculosis Test (Amplicor; Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, NJ)* [56-60]. Recentemente tem-se assistido ao desenvolvimento de novos *kits* comerciais como o *INNO-LiPA MYCOBACTERIA (Innogenetics, Ghent, Belgium)*, *GenoType Mycobacterium (Hain, Germany)* e *GenoType MTBC (Hain, Germany)*. Cada um destes testes apresenta um conjunto de sondas específicas, tendo como base as zonas de maior relevância na identificação destas espécies, tais como *rRNA16S*, *rRNA23S*, *gyrB* [61-63]. Mais recentemente têm sido exploradas metodologias baseadas em sistemas nanotecnológicos na tentativa de desenvolver sistemas de detecção com elevada sensibilidade e especificidade. Dentro destes sistemas encontram-se a metodologia de nanopartículas desenvolvido por Baptista *et al.* [38], Soo *et al.* [64] e Liandris *et al.* [65].

1.5 *Plasmodium* sp.

A malária é causada por um protozoário do género *Plasmodium*. Dentro deste género as espécies que causam a doença em humanos são *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, e *P. ovale*. Contudo, *P. falciparum* é a espécie com maior relevância uma vez que é o agente que causa o tipo de doença mais severa com maiores taxas de mortalidade [66,67].

Na grande maioria dos países com grande incidência desta doença recorre-se ao diagnóstico clínico e consequente confirmação por microscopia [68-72]. Recentemente foram desenvolvidos *kits* de diagnóstico rápido baseados em métodos imunocromatográficos [70], sondas de DNA e *Nested-PCR* [73-76]. Os estudos dos mecanismos de infecção e de resposta imunitária são efectuados recorrendo a modelos animais. Uma vez que a grande maioria das estirpes de *Plasmodium* não são patogéneos naturais de roedores, recorre-se a múltiplas espécies como; *P. berghei* (ANKA; PBA), *P. vinckei* e *P. chabaudi* [77-80].

No presente projecto utilizou-se uma sonda específica para *P. berghei* (ANKA). Pretende-se com este sistema, numa primeira fase, desenvolver uma metodologia que permita facilitar a investigação destes modelos animais, pela quantificação de RNA (quantificação da expressão genética), e numa segunda fase o desenvolvimento de um sistema de diagnóstico para *Plasmodium* sp., que provocam doença em humanos.

1.6 Objectivos

O presente projecto tem como objectivo desenvolver uma estratégia de detecção específica de sequências de DNA e para identificação de *M. tuberculosis* e *P. berghei* baseada em Au-nanossondas, adaptado de Baptista *et al.* [33].

Especificamente pretende-se:

Análise de sequências específicas dos agentes a detectar - *Mycobacterium sp.* e *Plasmodium sp.*;

Síntese e caracterização de nanossondas de ouro (ensaio de estabilidade em função da força iónica e utilização para hibridação em controlos);

Optimização das condições de hibridação para identificação e discriminação de sequências específicas de DNA sozinhas e em misturas controladas (*spiked mixtures*);

Estudos de limite de sensibilidade e de efeitos de contaminantes químicos e biológicos;

Utilização das nanossondas para quantificação do DNA (semi-quantitativo);

Análise da capacidade de detecção dos alvos específicos e com *mismatches* (associados à resistência a antibióticos - MDR TB);

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes

Reagente	Fabricante
Cloreto de magnésio hexa-hidratado	Merck
Acetato de sódio tri-hidratado	
SDS 90% (w/v) p.a. (Dodecilsulfato de sódio)	
EDTA (Ácido etileno di-Amino tetra-acético)	
Ácido bórico	
Hidróxido de sódio (NaOH)	
Citrato de sódio tri-hidratado 99,0% (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O) p.a.	
Cloreto de sódio p.a.	Sigma
Ampicilina	
Ácido cloroáurico tri-hidratado (HAuCl ₄ .3H ₂ O)	
Fenol	
Clorofórmio p.a.	
Ditiotreitol (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂) 1M	
Hidrogenofosfato de sódio (Na ₂ HPO ₄)	Fluka
Di-Hidrogenofosfato de sódio (NaH ₂ PO ₄)	
Tris(hidroxil)aminometano (TRIS)	
Ácido acético (Glacial)	
Etanol absoluto	Panreac

Todos os reagentes não discriminados foram fornecidos por Merck, Fluka, Riedel-de Haen e Sigma Chemical Company, com o mais elevado grau de pureza disponível.

Reagente
RNase (DNase free)
Taq DNA Polimerase
GelRed®
Agarose
Ladder de DNA GeneRuler™

Todos os reagentes biológicos utilizados foram fornecidos pela Fermentas.

2.1.1 Oligonucleótidos de DNA

Oligonucleótido	Sequência (5'-3')	Tm ¹ (°C)	Observações
PlasmBerg	CAC ATA AAC GTC AAA ACC AAT CTC C	56	Modificado (C6 - tiol em 5')
PlasmFish	CAC ATA AAC GTC AAA CCA ATC TCC	55	
MycComplex1⁽¹⁾	GAT CGC CTC CAC GTC C	54	
Rpo516WT	CAG CTG AGC CAA TTC ATG GA	55	
Rpo531WT	ACC CAC AAG CGC CGA CTG TC	62	
Rpo516MUT	CAG CTG AGC CAA TTC ATG GT	56	
Rpo531MUT	ACC CAC AAG CGC CGA CTG TT	62	
pJetFWD⁽²⁾	GCC TGA ACA CCA TAT CCA TCC	55	Primer de PCR (pMTub e pKA)
pJetRev⁽²⁾	GCA GCT GAG AAT ATT GTA GGA GAT C	56	
M13FWD⁽³⁾	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	64	Primer de PCR (clones pRpoWT, RpoA516V, RpoS531L e pANKA)
M13REV⁽³⁾	CAG GAA ACA GCT ATG AC	47	
MTubComp	GGC CGC TGC GGC GGG GCT CAG ATC GCC TCC ACG TCC	-	Alvo sintético complementar à sonda MTub
PlasmBergComp	GGC CGC TGC GGC GGG GCT CAG AGA GAT TGG TTT TGA CGT TTA TGT G	-	Alvo sintético complementar à sonda PlasmBerg
PlasmFishComp	GGC CGC TGC GGC GGG GCT CAG AGG AGA TTG GTT TGA CGT TTA TGT G	-	Alvo sintético complementar à sonda PlasmFish

(1) Baptista *et al.* [35]

(2) CloneJET™ PCR cloning Kit Fermentas®

(3) pUC/M13 Sequencing Primers Promega®

Todos os Oligonucleótidos de DNA foram fornecidos por StabVida

2.2 DNA template/alvo

Clones *template*: *pMTUB*, *pRpoWT*, *pRpoA516V*, *pRpoS531L*, *pMKA* e *pANKA*

As sequências dos fragmentos clonados, assim como os vectores utilizados para a clonagem estão descritos no Anexo A. Os clones *pRpoWT*, *pRpoA516V*, *pRpoS531L* foram construídos e gentilmente cedidos pela Prof. Doutora Isabel Portugal, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O clone *pMKA* foi construídos por Gonçalo Dória, a partir de um amplicão contendo a sequência do gene *rpoB* de *Mycobacterium Kansasii* cedido pela Prof. Doutora Isabel Couto do Instituto de Higiene e Medicina Tropical. O clone *pANKA*, contendo a sequência do gene rRNA 18S de *Plasmodium berghei* foi construído e gentilmente cedido pelo Prof. Doutor Miguel Prudêncio, do Instituto de Medicina Molecular.

Todos os clones foram confirmados por sequenciação.

¹ Temperatura de melting.

2.3 Meios de Cultura

LB

10% (p/v) Triptona/Peptona
5% (p/v) Extracto de Levedura
5% (p/v) NaCl
Autoclave

LA

10% (p/v) Triptona/Peptona
5% (p/v) Extracto de Levedura
5% (p/v) NaCl
2% (p/v) Agar
Autoclave

2.4 Soluções

Solução Lise 1

50 mM glucose
25 mM Tris-Cl (pH 8,0)
10 mM EDTA (pH 8,0)
Autoclave

Solução Lise 2

0,2 N NaOH
1% (p/v) SDS

Solução Lise 3

60 mL de Acetato de Sódio 5 M
11,5 mL de Ácido Acético Glaciar
28,5 mL de H₂O

Tampão de Síntese I

Tampão fosfato 10 mM, pH 8
2% SDS

Tampão de Síntese II

Tampão fosfato 10 mM pH 8
1,5 M NaCl
0,01% SDS

Tampão Fosfato 100 mM, pH 8 (100 mL)

6,8 mL NaH_2PO_4 1 M
93,2 mL Na_2HPO_4 1 M

TBE (1X)

90 mM Tris-Borato
2 mM EDTA

2.5 Equipamento

Modelo	Fabricante
Tpersonal Combi	Biometra
My Cyclor Thermal Cyclor	BioRad
DNA Engine Peltier Thermal Cyclor	BioRad
PTC-100 Programable Thermal Controler	MJ Research, Inc.
UVmini-1240	Shimadzu
Infinite M200 (Leitor de Microplacas)	Tecan
Spectrophotometer ND1000	NanoDrop
Universal Hood II - Gel Doc EQ	BioRad
Centrifuga Refrigerada (3-16K)	Sartorius
Centrifuga de Bancada (1-14)	Sartorius
Banho de Ultra-sons - P selecta	Ultrasons
Sonorreactor - UTR200	Heilscher Ultrasound Tech

2.6 Métodos Gerais

2.6.1 Preparação de alvos

2.6.1.1 Extracção de DNA plasmídico (DNAP)

As extracções de DNA plasmídico foram realizadas pelo método de lise alcalina (Sambrook *et. al.* 1989):

1. Inocular 10 mL de meio rico (LB), contendo a concentração de 150 µg/mL de Ampicilina, a partir de uma colónia de bactérias transformadas.
2. Transferir as células para *ependorfs* de 1,5 mL, e centrifugar durante 5 minutos a 9000 g e 4 °C.
3. Remover o meio e substituir por 150 µL de Solução Lise I.
4. Ressuspender e manter em gelo por 5 minutos
5. Adicionar 300 µL de Solução Lise II e incubar em gelo (5 minutos).
6. Adicionar 225 µL de Solução Lise III e misturar por inversão. Incubar em gelo entre 15 minutos e 4 horas.
7. Centrifugar durante 15 minutos a 15500 g e 4 °C.
8. Transferir o sobrenadante para um *ependorf* novo e adicionar dois volumes de etanol 100%.
9. Incubar a -20 °C / 2 horas ou -70 °C / 45 min.
9. Recolher o precipitado obtido por centrifugação dos tubos a 15500 g e 4 °C durante 15 minutos.
10. Lavar com etanol a 70% e secar durante 5 minutos recorrendo a um *Concentrator SVC-100H (Savant Speed Vac)*.
11. Ressuspender o *pellet* em 225 µL de água bidestilada e filtrada.
12. Adicionar RNase (1:50 volume total) e incubar pelo menos 3 horas a 37 °C.
13. Adicionar o mesmo volume de fenol e misturar em vortex durante 1 minuto.
14. Centrifugar a amostra a 15500 g durante 3 minutos. Remover 450 µl da fase aquosa para um tubo novo e adicionar o mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamilico (24:1). Misturar em vortex durante 1 minuto.
15. Centrifugar a 9000 g durante 3 minutos. Remover 400 µL de fase aquosa e transferir para novo *ependorf*.
16. Adicionar 1:10 de volume de NaCH₃COO 3 M pH 7.5 e dois volumes de etanol 100%. Incubar a -20 °C / 2 horas ou -70 °C / 45 min.

17. Recolher o precipitado obtido por centrifugação dos tubos a 15500 g e 4 °C durante 15 minutos. Lavar com etanol a 70%, secar e ressuspender em 40 µL de água.

2.6.1.2 Amplificação de ácidos nucleicos por PCR (Saiki et al.1988)

1. Para 100 µL de reacção de PCR preparar a mistura:

Volume (µL)	Componente	Concentração stock	Concentração na reacção
10	Tampão de PCR (GE Healthcare)	10 X	1 X
4	dNTPs mix	(5 mM)	0,2 mM
4	Oligonucleótido Iniciador FWD	20 µM	0,8 µM
4	Oligonucleótido Iniciador Rev	20 µM	0,8 µM
0.5	Taq DNA polimerase	5 U.µL ⁻¹	25 mU.µL ⁻¹

2. Adicionar em cada *ependorff*:

DNA molde 1 µg

Prefazer o volume para 100 µL com H₂O bidestilada, filtrada e autoclavada. No tubo de controlo substituir o DNA molde pelo mesmo volume de H₂O bidestilada e filtrada.

3. Todos os *ependorfs* foram colocados num termociclador e sujeitos ao programa de ciclos térmicos:

- | | | | |
|-----|--|----------|---|
| (1) | 1 min. | 95 °C | Desnaturação inicial |
| (2) | 30 seg. | 95 °C | Desnaturação |
| (3) | 1 min. | 50-60 °C | Hibridação (Dependendo da sequência de primers utilizada) |
| (4) | 30 seg. | 72 °C | Polimerização |
| (5) | Os passos 2 a 4 foram repetidos 30 vezes | | |
| (6) | 7 min. | 72 °C | Polimerização final |

A quantificação de ácidos nucleicos foi efectuada por espectrofotometria de UV/Vis (NanoDrop - ND1000):

2.6.1.3 Fragmentação de ácidos nucleicos com sono-reactor

A fragmentação de ácidos nucleicos foi realizada num *ependorf* de 1,5 mL com 100 µL de DNA plasmídico a 200 µg/mL:

1. Incubar amostras a 95 °C durante 10 minutos.
2. Sonicar com amplitude de 80% durante 5 minutos.
3. Repetir os passos 1 e 2 com um intervalo de 10 minutos
4. Deixar arrefecer durante 1 hora à temperatura ambiente.

2.6.2 Preparação de Sondas

2.6.2.1 Síntese de AuNPs (método adaptado de Lee e Meiser, 1982)

Todo o material de vidro foi previamente tratado com *aqua regia* (HCl:HNO₃, 1:3) e lavado com água milliQ (18,2 MΩ.cm⁻¹ a 25 °C).

1. Refluxar 250 mL de uma solução de HAuCl₄ 1 mM em balão de fundo redondo com capacidade volúmica de 500 mL.
2. Adicionar 50 mL de uma solução de citrato de sódio 38,8 mM. Manter em refluxo durante 30 minutos.
3. Deixar arrefecer até a temperatura ambiente e deixar em repouso durante 12 horas, protegido da luz.

2.6.2.2 Desenho da sequência de oligonucleótidos

As sequências utilizadas derivam do gene *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis* e do gene *rRNA18S* de *Plasmodium berghei*, disponíveis na base de dados *Nucleotide*, disponibilizada pela página de internet da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), com os códigos de acesso BX842574 e M19712 respectivamente.

As sequências dos oligonucleótidos encomendados foram desenhadas com auxílio da ferramenta informática *SerialCloner 1-3*.

2.6.2.3 Tratamento do oligonucleótido funcionalizado (tiolado em 5')

Os oligonucleótidos funcionalizados com um grupo tiol em 5' foram recebidos na forma liofilizada e foram tratados pelo seguinte processo:

1. Ressuspender o oligonucleótido modificado em 100 μ L de DTT 0,1 M, incubar à temperatura ambiente durante 2 horas.
2. Adicionar 900 μ L de H₂O bidestilada filtrada e autoclavada.
3. Efectuar 3 extracções com acetato de etilo (2:1 v/v), seguido de purificação em coluna NAP-5 (GE HealthCare, United Kingdom) de acordo com as especificações do fabricante.
4. Quantificar o oligonucleótido eluído por espectroscopia de UV/Vis (NanoDrop - ND1000);

A quantificação dos oligonucleótidos funcionalizados com um grupo tiol em 5' é efectuada através da absorvância a 260 nm multiplicada por um valor característico de cada oligonucleótido fornecido pela empresa que sintetizou os oligonucleótidos (StabVida), este valor correlaciona a absorvância e a concentração molar dos oligonucleótidos funcionalizados.

2.6.2.4 Síntese de Au-nanossonda

As nanossondas, partículas funcionalizadas por tiol-ssDNA, foram sintetizadas recorrendo a uma modificação do método descrito por Hurst *et al.*

1. Adicionar os oligonucleótidos purificados à suspensão coloidal de nanopartículas de ouro na razão molar pretendida.
2. Adicionar tampão de síntese I à mistura anterior numa proporção volúmica (v/v) de 1:200.
3. Adicionar tampão de síntese II em intervalos de 20 minutos, de modo a perfazer a concentração final de NaCl; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 M. Armazenar durante a noite a 25 °C.
4. Proceder a 2 lavagens do precipitado resultante com um volume de tampão fosfato 10 mM pH 8, seguidas de dois passos de lavagem com um volume de tampão fosfato

- 10 mM pH 8 0,1 M NaCl (precipitação por centrifugação a 15500 g durante 20 min.).
5. Ajustar a concentração final das Au-nanossondas a 15 nM com tampão fosfato 10 mM pH 8 0,1 M NaCl; de acordo com $\epsilon_{526\text{nm}}$ de nanopartículas de ouro de $2,33 \times 10^8 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Liu et al., 2007)
6. Armazenar ao abrigo da luz a 4 °C

2.6.3 Ensaios colorimétricos

Mistura reaccional (para 30 μL)

Volume (μL)	Componente	Concentração Stock	Concentração na Reacção
5	Au-nanossonda	15 nM	2,5 nM
3	DNA Alvo	300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
17	Tampão fosfato 10 mM pH 8	-	-

2. Programa de Ciclos Térmicos:

- (1) Desnaturação 95 °C, 10 minutos
- (2) Renaturação 95 °C até 20 °C a 0,1 °C.s⁻¹
- (3) Repouso 20 °C durante 17 minutos

3. Adição de 5 μL de electrólito (NaCl, MgCl_2) para uma concentração mínima necessária para a indução de agregação.
4. Após 15 minutos recolher os espectros de absorvância numa amplitude de comprimentos de onda entre 400 e 800 nm.

3. Resultados e Discussão

3.1 Síntese e caracterização de nanossondas

3.1.1 Estabilidade de ouro coloidal

As nanopartículas de ouro (AuNP) foram sintetizadas recorrendo ao método de redução por citrato descrito inicialmente por Lee e Meisel, 1982. As AuNPs foram caracterizadas e quantificadas por espectroscopia de UV/Visível, na presença e ausência de um electrólito (NaCl) para alteração da força iónica do meio em 0,1M (Figura1-a).

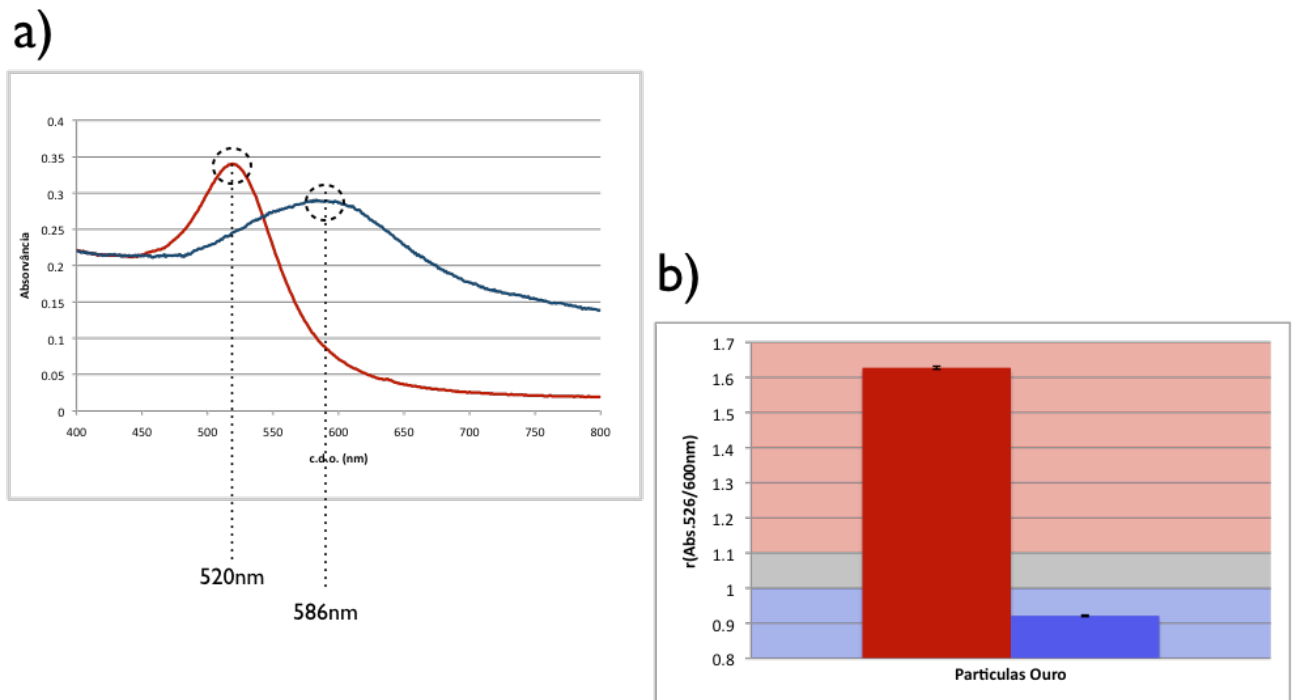


Figura 1: a) Espectro de absorvância de AuNPs; b) Modelo para tratamento dos dados, de testes colorimétricos de Au-nanossondas

a) Vermelho: espectro de partículas (diluição 1:10 (v/v)); Azul : espectro de partículas em solução com força iónica $I=0,1$ M (diluição 1:10 (v/v)); **b)** Valores de r (Abs.) para partículas a 2.5 nM; A vermelho partículas em H_2O a Azul partículas em H_2O com $I=0,1$ M. Para valores de r (Abs.) $>1,1$ teste positivo (presença de alvos complementares); r (Abs.) <1 teste negativo (ausência de alvos complementares); $1 < r$ (Abs.) $< 1,1$ zona cinzenta do estudo.

A suspensão de AuNPs apresenta um máximo de absorvância a 520 nm (solução vermelha), característico de uma suspensão de nanopartículas com diâmetro

aproximado de 15 nm [33]. Após adição do electrólito verifica-se um desvio do pico da SPR para o vermelho com máximo de absorvância a 586 nm (solução azul). Verifica-se também um alargamento da banda de absorvância, este facto é coerente com a agregação das nanopartículas [28]. Estes sistemas com SPR interagem com a luz apresentando um fenómeno de pseudo-absorvância. Desta forma é possível efectuar o cálculo de concentração pela aproximação à lei de Lambert-Beer, assumindo $\epsilon_{(526)} = 2,33 \times 10^8$ para o comprimento de onda de 524 nm [27]. A concentração das nanopartículas sintetizadas é de 14,6 nM.

O método que se pretende desenvolver é baseado no sistema *non-crosslinking* descrito por Baptista *et al.* [33], que prevê a discriminação de estados de agregação de nanossondas, construídas com nanopartículas. Na presença de alvo complementar as Au-nanossondas permanecem uniformemente distribuídas, traduzindo-se numa cor vermelha da suspensão (resultado positivo), na ausência de alvo complementar as Au-nanossondas agregam, traduzindo-se numa cor azul da suspensão (resultado negativo).

Os ensaios efectuados durante o presente estudo foram analisados recorrendo a um espectrofotómetro de microplacas (*Infinite M200 Tecan*), neste equipamento o percurso óptico analisado é variável. Desta forma é necessário comparar diferentes medições obtidas, recorrendo a uma normalização interna do espectro, eliminando a dependência da intensidade do espectro.

Normalização utilizada para a discriminação da extensão de agregação:

$$r(Abs.) = \frac{Abs_{CDO(forma.não.agregada)}}{Abs_{CDO(forma.agregada)}}$$

Esta expressão apresenta uma forma generalista de correcção dos resultados obtidos. Uma vez que cada sonda sintetizada apresenta características espectroscópicas únicas, é necessário verificar qual o comprimento de onda a que ocorre o máximo de absorvância de ambas as formas de agregação.

Uma vez que se recorre à razão dos valores de absorvância, não são comparados valores de intensidade absoluta, mas sim a nível da proporção relativa que cada um destes valores apresenta no espectro. Esta normalização permite ainda uma simplificação na análise dos resultados. Considerando-se assim que para $r(Abs.) < 1$ as

Au-nanossondas se encontram maioritariamente agregadas. Esta situação significa que o valor de absorvância da espécie agregada é superior ao valor de absorvância da espécie não agregada, traduzindo-se numa suspensão de cor azul (teste negativo). Para $r(\text{Abs.}) > 1,1$ as partículas/sondas encontram-se maioritariamente não agregadas. Esta situação significa que o valor de absorvância da espécie não agregada é superior ao valor de absorvância da espécie agregada, traduzindo-se numa suspensão de cor vermelha (teste positivo). Uma vez que se pretende o desenvolvimento de um teste de diagnóstico biológico em amostras complexas, e possivelmente com contaminantes, reservamos os valores $1 < r(\text{Abs.}) < 1,1$, como zona cinzenta (Figura 1-b). Esta zona é caracterizada por um intervalo de 10% do valor de razão, e representa uma baixa diferenciação entre as espécies presentes na amostra testada. Podem recair sobre esta zona, testes em que a amostra se encontra abaixo do limite de detecção do sistema estudado, ou amostras contendo substâncias que possam modelar o comportamento do sistema.

3.1.2 Análise de sequências: génicas específicas com vista à funcionalização nanopartículas de ouro coloidal

Foram desenhadas 5 sondas com sequências derivadas do gene que codifica para a subunidade beta da RNA polimerase de *M. tuberculosis*. A sonda MTub foi desenvolvida por *Baptista et al.* 2005, e apresenta uma sequência apropriada para a identificação e discriminação deste organismo relativamente aos restantes membros do complexo *M. Tuberculosis* [38]. Foram ainda desenhadas quatro sondas para a detecção de polimorfismos presentes neste mesmo gene que estão associados à resistência a rifampicina. As sondas Rpo516WT e Rpo531WT, com sequências complementares ao gene *wild-type*, e as sondas Rpo516MUT e Rpo531MUT, com sequências complementares ao gene mutado, apresentado por organismos que adquiriram resistência a este antibiótico. A terminologia 516 e 531 refere-se ao codão do gene *rpoB* em que se encontra o polimorfismo que se pretende detectar (Figura 2).

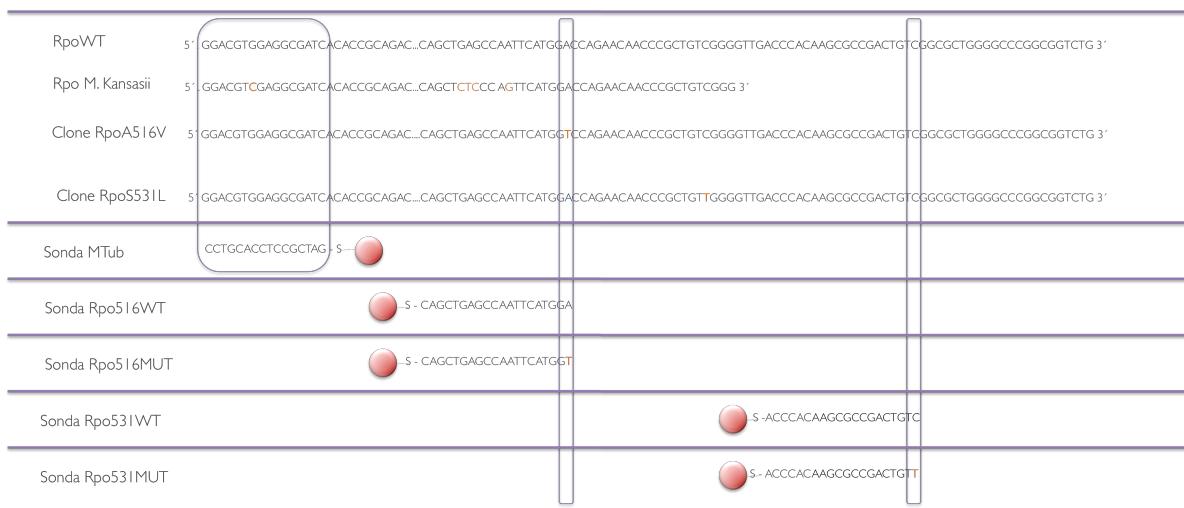


Figura 2: Análise das sequências do gene *rpoB* de *M. tuberculosis* e *M. Kansasii*
Alinhamento das sequências dos genes *rpoB* de *M. tuberculosis* e *M. Kansasii*, para construção de sondas específicas para cada um dos clones utilizados no presente estudo.

A sonda MTub, específica para a detecção de *M. tuberculosis*, apresenta a diferença de uma base relativamente à sequência de *M. Kansasii* tipo I. As sondas para detecção de polimorfismos que conferem resistência a antibióticos foram desenhadas com 20 bp, contendo o nucleótido passível de conter a mutação na extremidade 3' [35].

Para a detecção de *Plasmodium berghei* foi desenhada uma sonda (PlasmBerg) derivada da sequência de subunidade 18S de rRNA [78]. Foi ainda desenhada uma outra sonda (PlasmFish) que apresenta uma deleção de uma base na sequência de detecção para o estudo da especificidade deste sistema (Figura 3).

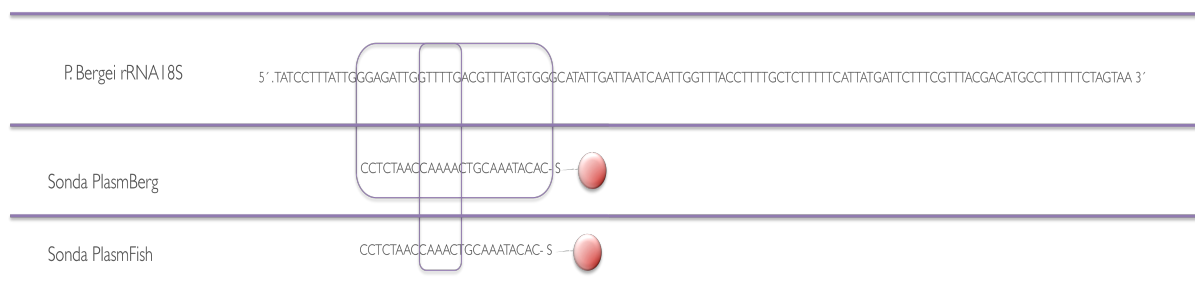


Figura 3: Análise da sequências do gene rRNA 18S de *P. berghei*
Alinhamento das sequências dos gene rRNA 18S de *P. berghei* , para construção de sondas específicas dos clones utilizados no presente estudo.

3.2 Caracterização das Au-nanossondas

A funcionalização de AuNPs é conseguida através da substituição de iões citrato presentes à superfície por oligonucleótidos tiolados. Para o efeito, é necessário adicionar um electrólito permitindo a redução da repulsão electrostática proporcionada pelas partículas carregadas, permitindo assim a aproximação entre os reagentes. Os oligonucleótidos alteram as características da superfície das nanopartículas conferindo maior estabilidade relativamente à força iónica.

As nanopartículas foram funcionalizadas com oligonucleotidos tiolados, numa razão de 200 oligos por partícula (Oligo/NP), recorrendo à utilização de ultra-sons, como descrito por Hurst *et al.* [81]. Esta metodologia possibilita a optimização da funcionalização, pela homogeneização da distribuição de oligonucleótidos à superfície das partículas, eliminando oligonucleótidos adsorvidos inespecificamente à superfície das NPs.

Foram efectuados testes colorimétricos com as sondas resultantes, utilizando um gradiente de electrólito. A Tabela 1 apresenta a força iónica mínima necessária à indução de agregação das diferentes sondas sintetizadas.

Tabela 1: Efeito da força iónica na síntese de sonda

Valores de força iónica mínima necessária para a indução de agregação das sondas sintetizadas recorrendo a dois patamares de [NaCl] na síntese.

Sonda	[NaCl] de síntese (M)	Força Iónica mínima de Agregação (M)
MTUB	0,1	0,060 ± 0,005
	0,3	0,135 ± 0,005
PlasmBerg	0,1	0,150 ± 0,005
	0,3	0,210 ± 0,005

Verifica-se que as sondas sintetizadas com [NaCl]=0,3M apresentam uma maior estabilidade comparativamente às sondas sintetizadas recorrendo a [NaCl]=0,1M. Pode-se verificar que esta diferenciação é maior para a sonda MTUB. Esta diferenciação pode estar associada à diferença de tamanho do oligonucleótido presente à superfície da nanopartícula.

3.2.1 Efeito da razão oligo/partícula na estabilidade de sondas

A substituição de íons citrato por oligonucleótidos à superfície das nanopartículas altera extensivamente as suas propriedades. Foi estudada a influência da razão Oligo/NP na estabilidade das Au-nanossondas. Para tal, foram sintetizadas sondas com diferentes razões Oligo/NP e com diferentes tamanhos de oligonucleótidos, sendo efectuados testes colorimétricos com as sondas resultantes utilizando um gradiente de electrólito. A tabela 2 apresenta a força iónica mínima necessária à indução de agregação das diferentes sondas sintetizadas.

Tabela 2: Efeito da razão Oligo/Partícula e utilização de Ultra-sons na estabilidade de sondas
Valores de força iónica mínima necessária para a indução de agregação.

Sonda	Razão Oligo/partícula	Força Iónica de Agregação (M)	
MTub (16 bases)	100	S/ Ultra-sons	0,03± 0,005
		C/ Ultra-sons	0,03± 0,005
	130	S/ Ultra-sons	0,06± 0,005
		C/ Ultra-sons	0,075± 0,005
	160	S/ Ultra-sons	0,075± 0,005
		C/ Ultra-sons	0,105± 0,005
	180	S/ Ultra-sons	0,105± 0,005
		C/ Ultra-sons	0,12± 0,005
	200	S/ Ultra-sons	0,12± 0,005
		C/ Ultra-sons	0,135± 0,005
	220	S/ Ultra-sons	0,135± 0,005
		C/ Ultra-sons	0,135± 0,005
PlasmBerg (25 bases)	180	S/ Ultra-sons	0,18± 0,005
		C/ Ultra-sons	0,21± 0,005
	200	S/ Ultra-sons	0,21± 0,005
		C/ Ultra-sons	0,21± 0,005
	220	S/ Ultra-sons	0,21± 0,005
		C/ Ultra-sons	0,21± 0,005

Dentro da janela do estudo as sondas MTub demonstraram-se mais sensíveis à alteração desta razão, ainda assim, é perceptível que as sondas PlasmBerg com razões mais baixas apresentaram uma estabilidade inferior comparativamente às restantes.

As sondas PlasmBerg apresentam uma menor sensibilidade relativamente a este efeito, dentro da janela de estudo. Para esta sonda as razões utilizadas estão perto do limiar de funcionalização máxima. Verifica-se ainda que estas sondas apresentam uma estabilidade bastante superior relativamente às sondas MTub. Pode-se constatar uma

correlação entre tamanho do oligonucleótido, a extensão de funcionalização e a estabilidade final do sistema.

3.2.2 Efeito da utilização de ultra-sons durante a síntese de sondas

Recorreu-se então a métodos de síntese na presença e ausência de ciclos de ultra-sons, seguida da análise de estabilidade em função da força iónica (Tabela 2).

A utilização de ultra-sons durante o processo de síntese leva a um acréscimo de estabilidade das sondas sintetizadas. A variação de estabilidade é da mesma ordem de grandeza da variação de estabilidade conseguida pela alteração da razão de oligonucleótidos por partícula. Este fenómeno sugere que este método optimiza o processo de funcionalização, possibilitando a utilização de menores quantidades de oligonucleótidos na funcionalização de nanopartículas. No entanto, apesar deste método permitir uma funcionalização mais eficiente, não consegue aumentar a extensão da funcionalização.

3.2.3 Análise da extensão de Funcionalização

Em todos os resultados obtidos anteriormente utilizou-se correlações entre estabilidade das nanossondas sintetizadas em função da razão Oligo/NP. Foi efectuada uma análise do nível de funcionalização das sondas sintetizadas, pelo método de mobilidade electroforética, desenvolvido por Pelegrino *et al.* [82]. As sondas foram submetidas a uma electroforese em gel de agarose 2% (p/v), 1% TBE a 60 V durante duas horas (Figura 4). As medições das distâncias percorridas foram efectuadas com o recurso ao programa informático *Macnification* versão 1.5.

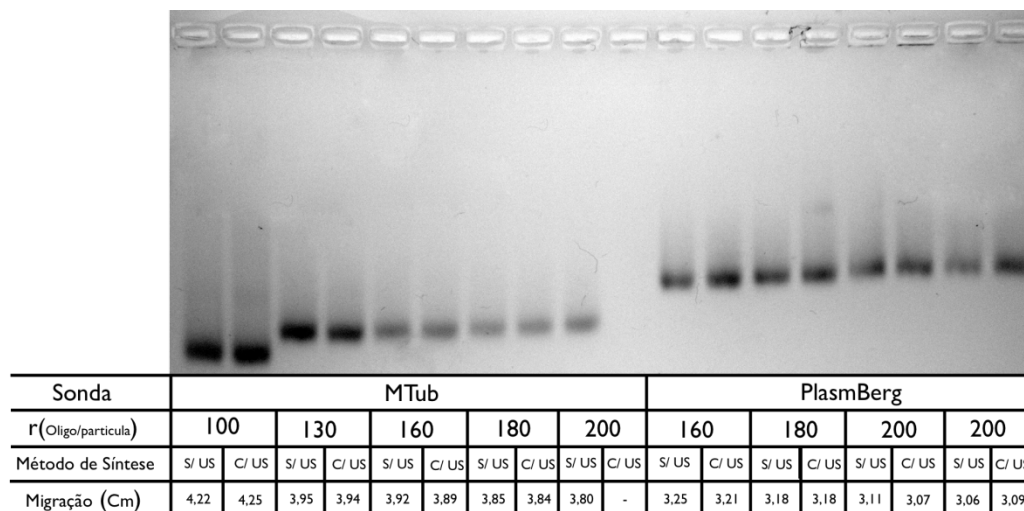


Figura 4: Electroforese de Au-nanossondas

Electroforese (60 V, 120 min.) em gel de agarose (2%; TBE 1X), visualização em transiluminador de luz visível; análise da migração das sondas resultantes das diferentes condições de síntese; Medições efectuadas recorrendo ao programa Macnification 1.5.

Verifica-se que existe uma correlação entre a razão Oligo/NP utilizados durante a síntese e a mobilidade das sondas. As sondas com razões Oligo/NP mais elevadas apresentam uma menor mobilidade e que as sondas PlasmBerg apresentam sempre uma mobilidade bastante inferior comparativamente às sondas MTub. Este fenómeno poderá estar associado ao tamanho do oligonucleótido utilizado (maior tamanho e peso às sondas).

O efeito de mobilidade é bastante semelhante ao efeito de estabilidade estudado anteriormente. Para razões Oligo/NP mais baixas, a mobilidade varia rapidamente, no entanto, para razões mais elevadas, esta variação é menor. Existe uma tendência para sondas sintetizadas com ultra-sons apresentarem uma mobilidade mais baixa, no entanto as variações são muito pequenas, apresentando-se dentro do erro de medição. Deste modo não é possível aferir a variação de mobilidade entre sondas sintetizadas com e sem ultra-sons. Estes resultados permitem apenas relacionar a dependência entre a quantidade efectiva de oligonucleótidos presentes à superfície das nanossondas com a sua estabilidade.

3.3 Detecção de DNA

Após o estudo da eficiência de funcionalização e estabilidade das nanossondas resultantes, procedeu-se à caracterização da capacidade de detecção de Alvos de DNA de acordo com o método de *non-crosslinking* [33,34,36,37].

3.3.1 Funcionalização de sonda

Na perspectiva de estudar sistematicamente a influência da razão Oligo/NP na capacidade de detecção das nanossondas foram realizados testes colorimétricos de sondas com diferentes razões oligo/partícula, recorrendo aos dois processos de síntese testados em 3.2.1. Foram testadas as sondas MTub e PlasmBerg com produtos de PCR obtidos pela amplificação de *pMTUB* e *pANKA*, onde foram previamente clonadas sequências do gene *rpoB* de *M. tuberculosis* e *rRNA18S* de *Plasmodium berghei* respectivamente.

A Tabela 3 apresenta a razão de absorvância $r(\text{Abs})$ obtida para a força iónica a que se obteve a maior diferenciação entre a presença de alvo complementar e alvo não complementar.

Tabela 3: Efeito da razão Oligo/Partícula e utilização de Ultra-sons na capacidade de detecção de DNA
Valores de $r(\text{Abs.})$ para a força iónica que permite melhor discriminação entre alvos.

Sonda	Razão Oligo/partícula	Método de Síntese	$r(\text{Abs.524/600 nm})$ alvo complementar	$r(\text{Abs.524/600 nm})$ alvo não complementar	Diferença entre $r(\text{Abs.})$	Alvos
MTub	100	S/ Ultra-sons	1,42±0,04	1,40±0,05	0,02	Alvo complementar pMTUB Alvo não complementar pANKA
		C/ Ultra-sons	1,77±0,19	1,61±0,26	0,15	
	130	S/ Ultra-sons	1,28±0,03	1,20±0,08	0,07	
		C/ Ultra-sons	1,44±0,12	1,35±0,14	0,08	
	160	S/ Ultra-sons	1,37±0,03	1,06±0,04	0,31	
		C/ Ultra-sons	1,41±0,12	1,23±0,09	0,17	
	180	S/ Ultra-sons	1,34±0,03	1,15±0,02	0,19	
		C/ Ultra-sons	1,34±0,01	1,19±0,05	0,15	
	200	S/ Ultra-sons	1,29±0,11	1,06±0,11	0,22	
		C/ Ultra-sons	1,42±0,04	1,21±0,04	0,20	
PlasmBerg	160	S/ Ultra-sons	1,25±0,04	1,17±0,04	0,14	Alvo complementar pANKA Alvo não complementar pMTUB
		C/ Ultra-sons	1,17±0,03	1,21±0,02	-0,035	
	180	S/ Ultra-sons	1,17±0,05	1,06±0,03	0,10	
		C/ Ultra-sons	1,34±0,14	1,09±0,04	0,25	
	200	S/ Ultra-sons	1,15±0,06	1,04±0,06	0,11	
		C/ Ultra-sons	1,35±0,11	1,11±0,06	0,25	
	220	S/ Ultra-sons	1,19±0,06	1,11±0,6	0,06	
		C/ Ultra-sons	1,26±0,004	1,01±0,03	0,26	
	220	S/ Ultra-sons	1,22±0,01	1,15±0,01	0,07	
		C/ Ultra-sons	1,32±0,01	1,02±0,03	0,29	

Para a sonda MTub verifica-se que existe um máximo de diferenciação entre alvo complementar e não complementar para a razão de 160 oligonucleótidos, para a síntese sem o recurso a ultra-sons. Verifica-se ainda que é a condição em que a maior discriminação apresenta valores de $r(\text{Abs.})$ passíveis de utilização para a detecção.

As sondas com menor razão Oligo/NP apresentam uma diferenciação de $r(\text{Abs.})$ baixa, e para valores de $r(\text{Abs.})$ elevados, indicando a estabilização por DNA não complementar, o que reduz a especificidade do sistema. Com o aumento da razão Oligo/NP esta estabilização por DNA não complementar diminui possibilitando assim a discriminação entre alvos para valores de $r(\text{Abs.})$ de interesse.

No método de síntese com ultra-sons não existe uma correlação entre a razão Oligo/NP e a capacidade de detecção, evidenciando que possivelmente esta metodologia poderá apresentar efeitos desconhecidos, além da optimização da funcionalização.

Para a sonda PlasmBerg os resultados demonstram que existe uma discriminação entre alvo complementar e não complementar. Para esta sonda a condição que permite a melhor diferenciação entre alvo complementar e não complementar é a de 200 oligonucleótidos por partícula, para a síntese com o recurso a ultra-sons. Verifica-se ainda que para razões Oligo/NP mais baixas existe estabilização do sistema por alvos não complementares. Mais uma vez não é possível relacionar a influência de ultra-sons na síntese das nanossondas com a Oligo/NP.

Para sondas mais pequenas existe uma maior dependência da quantidade de oligonucleótidos presentes à superfície. Este fenómeno está relacionado com a possibilidade de impedimento estereoquímico que impossibilita a hibridação de alvos com os oligonucleótidos sonda. Estes sistemas apresentam uma curvatura da superfície, o que se traduz na variação de área específica ocupada ao longo do oligonucleótido. A área de superfície ocupada varia exponencialmente com a distância das bases dos oligonucleótidos à superfície do ouro (r^2). Este fenómeno permite que para oligonucleótidos maiores exista eficiências de hibridação mais elevadas para a mesma quantidade de oligonucleótidos presentes à superfície. No entanto, podemos verificar que para os oligonucleótidos sonda mais pequenos a diminuição da cobertura do suporte não é solução para optimizar a resposta do sensor, já que possibilita a adsorção e consequente estabilização por ligações não específicas.

Pelos resultados obtidos não é evidente o efeito proporcionado pela utilização de ultrasounds durante o processo de síntese, relativamente à capacidade de detecção do sistema. Os resultados apresentados permitem verificar que existe a modelação da capacidade de detecção do sistema de Au-nanossondas pela razão Oligo/NP e método de síntese.

3.3.2 Efeito do material biológico

As características intrínsecas [tamanho, a concentração, presença de contaminantes associados ao processo de extracção, e a natureza da amostra (ssDNA vs dsDNA)] dos alvos que pretendemos detectar, são factores que influenciam a resposta do sensor. Em situações de alvos de cadeia dupla poderá existir competição entre a hibridação com a cadeia complementar original e a cadeia complementar presente na nanossonda.

Para avaliar o efeito da estrutura e topologia do DNA alvo, foram utilizados alvos sintéticos, plasmídeos, plasmídeos fragmentados e produtos de PCR. Os alvos sintéticos utilizados foram desenhados para que 50% da sua sequência fosse complementar à sonda a testar, e os restantes 50% não apresentassem qualquer tipo de similaridade. O DNA plasmídico alvo resultou da extracção plasmídica dos clones *pMTUB*, *pRpoWT*, *pRpoA516V*, *pRpoS531L*, onde foram previamente clonadas sequências do gene *rpoB* de *M. tuberculosis*; *pMKansasii* onde foi previamente clonada a sequência do gene *rpoB* de *M. Kansasii* tipo I e *pANKA* onde foi previamente clonada a sequência do gene *rRNA18S* de *Plasmodium berghei*. Os produtos de PCR *MTUB(PCR)*, *RpoWT(PCR)*, *RpoA516V(PCR)*, *RpoS531L(PCR)* *MKansassi(PCR)* e *ANKA(PCR)* resultaram da amplificação das sequências clonadas nos plasmídeos *pMTUB*, *pRpoWT*, *pRpoA516V*, *pRpoS531L*, *pMKansasii*, *pANKA* respectivamente (Anexo A).

Procedeu-se aos testes colorimétricos da sonda MTub, na presença de alvos complementares e não complementares com concentrações em excesso, para que a resposta do sensor fosse apenas função da eficiência de hibridação. Os resultados

representam a razão de absorvância $r(\text{Abs})$ obtida para a força iónica mínima necessária à indução da agregação (Figura 5).

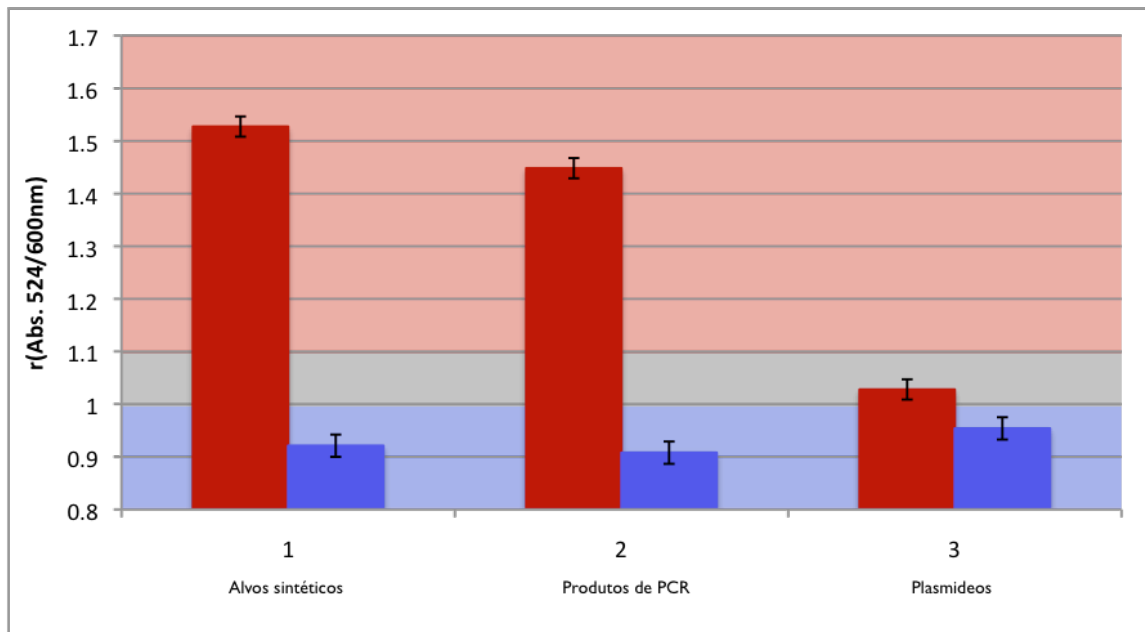


Figura 5: Teste colorimétrico de sonda *MTub* com diferentes alvos.

Testes colorimétricos de sonda *MTub*: Valores de $r(\text{Abs.})$ para teste efectuados com sonda a 2,5 nM, em tampão fosfato pH=7; Vermelho: alvo complementar; Azul: alvo não complementar. **1) Teste com alvos sintéticos**: alvo complementar *MTubComp* à concentração de 6 pM; alvo não complementar, *PlasmBergComp* à concentração de 6 pM; **2) Teste com produtos de PCR**: alvo complementar: *pMTub(PCR)* à concentração de 100 µg/mL; A azul, alvo não complementar *pANKA(PCR)* à concentração de 100 µg/mL; **3) Teste com Plasmídeos**: alvo complementar: *pMTub* à concentração de 100 µg/mL; alvo não complementar *pANKA* à concentração de 100 µg/mL; indução de agregação efectuada pela adição de MgCl_2 até força iónica de 0,08 M. Leitura de absorvância efectuada 15 minutos após a adição de electrólito.

A resposta do sensor para o alvo de PCR complementar demonstrou ser 8% inferior ao resultado obtido para alvo sintético. Este decréscimo é mais acentuado quando comparamos alvos sintéticos com plasmídeos, onde apesar de ser possível diferenciar entre alvo complementar e alvo não complementar, esta diferenciação não é suficiente para obter detecção dentro dos parâmetros estabelecidos. Neste caso, existe uma agregação bastante extensiva do sistema, fazendo com que o resultado para o alvo complementar se situe na zona cinzenta. O tamanho dos fragmentos utilizados é aproximadamente 10 vezes superiores aos produtos de PCR, e por sua vez 100 vezes superiores aos alvos sintéticos. Uma vez que foram utilizadas condições de excesso de alvo, este fenómeno poderá estar associado à eficiência de hibridação do alvo com a sonda. Este resultado indica que o tamanho do fragmento utilizado influencia a resposta do sistema de nanossondas. Nesta perspectiva recorreremos então à fragmentação dos alvos utilizados por tratamento com ultra-sons em sono reactor (Anexo B). A

fragmentação apresenta uma distribuição de tamanhos relativamente grande no entanto é evidente de uma maioria de fragmentos contidos entre 300 e 600 bp (tamanho semelhante aos amplicões previamente testados).

Procedeu-se a testes colorimétricos da sonda MTub com os plasmídeos fragmentados. Esta sonda foi testada na presença de *pMTub* contendo a sequência complementar e na presença de *pANKA* que não contem a sequência complementar a sonda, nas concentrações de DNA alvo reportadas para o ensaio com plasmídeos não fragmentados. Os resultados representam a razão de absorvância $r(\text{Abs.})$ obtida para a força iónica mínima necessária à indução da agregação (Figura 6).

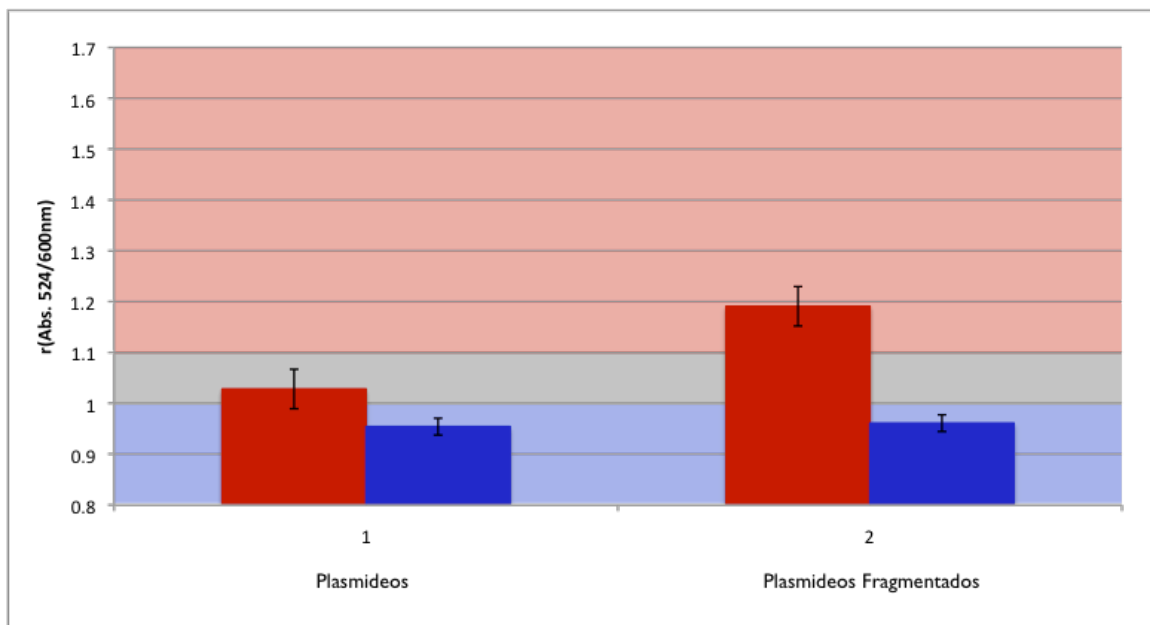


Figura 6: Teste colorimétrico de sonda MTub com Plasmídeos

Valores de $r(\text{Abs.})$ para teste efectuados com sonda a 2,5nM, em tampão fosfato pH=7; Vermelho: alvo complementar: *pMTub* à concentração de 100 µg/mL; Azul: alvo não complementar *pANKA* à concentração de 100 µg/mL; 1) Plasmídeos 2) plasmídeos fragmentados por ultra-sons em sonoreactor; indução de agregação efectuada pela adição de MgCl_2 até força iónica de 0,08 M. Leitura de absorvância efectuada 15 minutos após a adição de electrólito.

Com este ensaio podemos verificar que a sonda testada diferencia entre alvo complementar e alvo não complementar. No entanto, é de salientar que a resposta do sensor para o alvo de plasmídeo fragmentado complementar demonstrou ser 23% inferior ao resultado obtido para alvo sintético. Pelos resultados obtidos é possível verificar uma correlação entre o tamanho do alvo e resposta do sensor. O aumento de tamanho das sequências de DNA alvo diminui a estabilidade final das nanossondas. Uma vez que não se obteve uma fragmentação completa dos plasmídeos, não é possível comparar directamente todos os resultados. No entanto, é evidente que a

fragmentação possibilita a discriminação entre alvo complementar e não complementar. Este fenómeno poderá estar associado à eficiência de hibridação, que é dependente do tamanho dos alvos e oligonucleótidos sonda. Para alvos maiores esta eficiência é menor, o que se traduz num menor número de moléculas de DNA alvo presentes à superfície das nanossondas, e por sua vez numa menor estabilização relativamente à força iónica. Contudo, verifica-se que com um tratamento adequado da amostra o sistema tem a sensibilidade para a detecção de alvos sem recorrer a amplificação.

3.4 Optimização de Au-nanossondas

Após a caracterização do sistema relativamente à sua estabilidade e capacidade de detecção de DNA, era necessário otimizar cada uma das sondas específicas para *M. tuberculosis* e *P. berghei*.

3.4.1 Detecção de *Plasmodium berghei*

Todas as sondas funcionalizadas com o oligonucleótido PlasmBerg específico para a detecção de *P. berghei*, apresentaram capacidade de detecção. No entanto, a sonda funcionalizada com uma razão de 200 oligonucleótidos, otimizada pela utilização de ultra-sons, apresentou o melhor comportamento e reprodutibilidade de resultados. Desta forma prosseguiu-se com a optimização e estudo desta condição.

Verificou-se que existe uma correlação entre a presença de alvos complementares e a estabilização do sistema. Analisou-se a capacidade de quantificação de alvos pelo sistema de Au-nanossondas. Nesta perspectiva, efectuaram-se testes colorimétricos com concentrações crescentes de alvos, produtos de PCR de *pANKA* (alvo complementar) e produtos de PCR de *pMTub* (alvo não complementar), puros e em misturas de DNA, de amostras contendo concentrações de DNA total de 20, 40 e 80 µg/mL, com diferentes percentagens de alvo complementar (Anexo C). Os resultados representam a razão de absorvância $r(Abs)$ obtida em função da concentração de alvo na amostra, para a força iónica mínima necessária à indução da agregação (Figura 7).

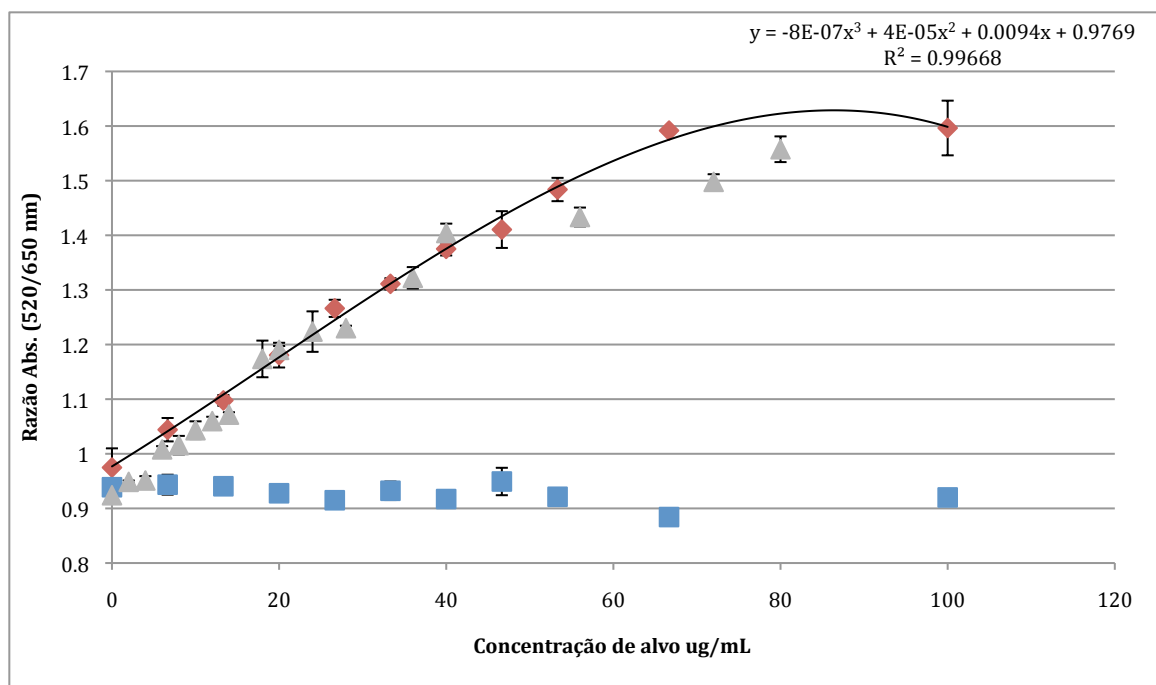


Figura 7: Quantificação de DNA alvo com sonda PlasmBerg

Valores de $r(\text{Abs.})$ para teste efectuados com sonda a 2,5 nM, em tampão fosfato pH=7; Vermelho, gradiente de alvo complementar *pANKA*(PCR); Azul, gradiente de alvo não complementar, *pMTub*(PCR); Cinzento, gradiente de alvo *pANKA*(PCR) em misturas de DNA com [*pMTub*(PCR) não complementar]. Indução de agregação efectuada pela adição de MgCl_2 até força iónica de 0,21 M. Leitura de absorvância efectuada 15 minutos após a adição de electrolito.

Verifica-se que existe um aumento da estabilização do sistema de nanossondas com o aumento da concentração de alvos até a um valor máximo (*plateau*). Este comportamento é normal em sistemas semelhantes de análise de DNA já que existe um valor máximo a partir do qual a superfície das sondas se apresenta saturada com alvos hibridados. Verifica-se que o comportamento deste sensor pode ser descrito por uma equação polinomial de grau 3 com índices de correlação elevados (0,997), apresentando um comportamento quase linear até a concentração de 65 $\mu\text{g/mL}$.

Verificou-se, ainda, que o limite de detecção mínimo deste sistema é de 13 $\mu\text{g/mL}$, valor ao qual $r(\text{Abs.}) > 1,1$; e que o limite de quantificação máximo do sistema é de 65 $\mu\text{g/mL}$, valor ao qual o sistema apresenta um ponto de saturação. Relativamente à presença de alvos não complementares à sonda testada, não existe qualquer correlação entre a concentração e a resposta do sensor. Para estes alvos temos $r(\text{Abs.}) = 0,93 \pm 0,02$

Verifica-se que o comportamento do sistema para misturas de ácidos nucleico é semelhante ao comportamento verificado em amostras contendo apenas DNA complementar. O comportamento deste sensor continua a ser descrito por uma

equação polinomial com elevados índices de correlação (0,991). O comportamento do sistema de nanossondas na presença de mistura de alvos é sobreponível com os testes de alvos puros. Verifica-se contudo, um aumento no limite de detecção para uma concentração de 18 µg/mL e um máximo de saturação da sonda para valores mais elevados de concentração de alvo.

O sistema é capaz de quantificação de DNA, mesmo na presença de outros ácidos nucleicos em cadeia dupla e do mesmo tamanho. No entanto, seria importante avaliar a influência de outros ácidos nucleicos com diferentes tamanho e diferentes características, analisando a possibilidade de detecção directa a partir de extracção total de ácidos nucleicos em amostras biológicas.

Para analisar a especificidade na presença de alvos parcialmente complementares, foi analisado o efeito de uma mutação *frameshift* no alvo a testar. Desenhou-se a sonda PlasmFish na qual a sequência apresenta a deleção de uma base relativamente à sequência do gene que codifica para a subunidade 18S de rRNA de *P. berghei*. Foram efectuados testes colorimétricos da sonda PlasmFish com alvo sintético PlasmfishComp (complementar à sonda), produto de PCR de *pANKA* (alvo com a mutação *frameshift*), e produto de PCR de *pMTub* (alvo não complementar). Os resultados representam a razão de absorvância $r(Abs)$ obtida para duas condições de força iónica. A primeira condição com força iónica menor do que a força iónica mínima necessária à indução da agregação e a segunda com a força iónica mínima necessária a indução de agregação (Figura 8).

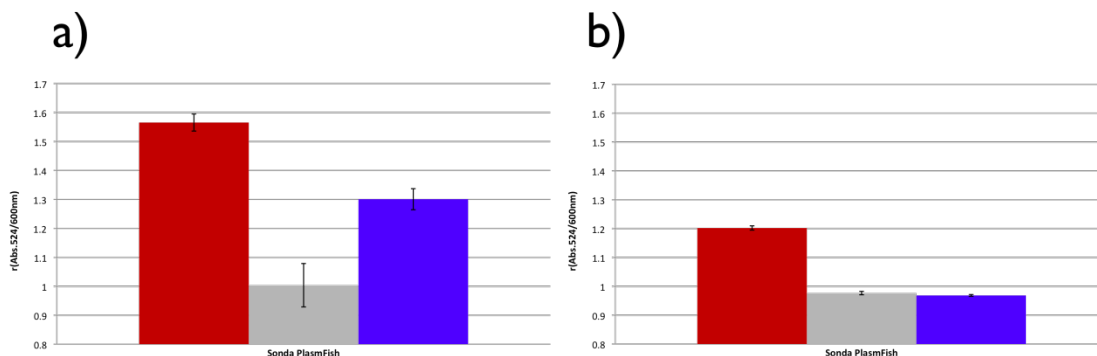


Figura 8: Especificidade de Au-nanossondas: Detecção de mutações *Frameshift*

Sonda PlasmFish: Valores de $r(Abs.)$ para teste efectuados com sonda a 2,5 nM, em tampão fosfato pH=7; Vermelho: alvo complementar PlasmFishComp a 6 pM; Cinzento, *pANKA*(PCR) (alvo com *frameshift*) a 100 µg/mL; Azul: alvo não complementar, *pMTub*(PCR) a 100 µg/mL. a) Indução de agregação efectuada pela adição de $MgCl_2$ até força iónica de 0,18 M, b) Indução de agregação efectuada pela adição de $MgCl_2$ até força iónica de 0,21 M. Leitura de absorvância efectuada 15 minutos após a adição de electrólito.

Os resultados obtidos demonstram que o sistema permite discriminar sequências com elevada similaridade (mutação *frameshift* por adição de uma base).

3.4.2 Detecção de *Mycobacterium tuberculosis*

3.4.2.1 Quantificação de DNA alvo

Todas as sondas funcionalizadas com o oligonucleótido MycComplex1, específico para a detecção de *M. tuberculosis*, apresentaram capacidade de detecção. No entanto, a sonda com a razão de 160 oligonucleótidos apresentou o melhor comportamento e reprodutibilidade de resultados. Desta forma prosseguiu-se com a optimização e estudo desta condição. Efectuaram-se testes colorimétricos com concentrações crescentes de alvos, produtos de PCR de *pMTub* (alvo complementar) e produtos de PCR de *pANKA* (alvo não complementar), puros e em misturas de DNA, de amostras contendo concentrações de DNA total de 20, 40 e 80 µg/mL, com diferentes percentagens de alvo complementar (Anexo D). Os resultados representam a razão de absorvância $r(\text{Abs})$ obtida em função da concentração de alvo na amostra, para a força iónica mínima necessária à indução da agregação (Figura 9).

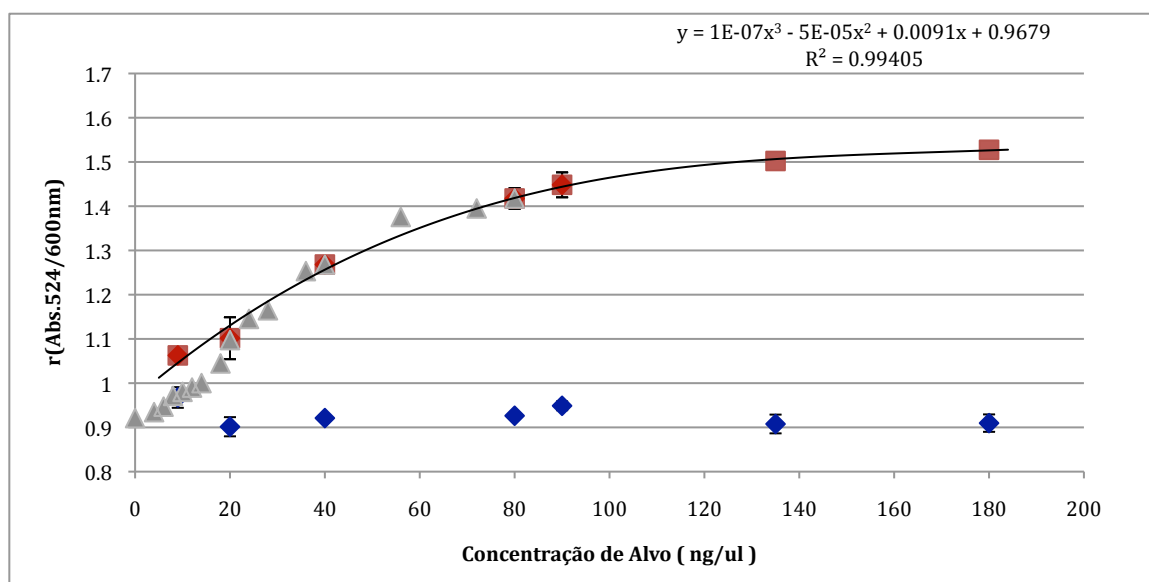


Figura 9: Quantificação de DNA alvo com sonda MTub

Valores de $r(\text{Abs.})$ para teste efectuados com sonda a 2,5 nM, em tampão fosfato pH=7; Vermelho: gradiente de alvo complementar *pMTub*(PCR); Azul: gradiente de alvo não complementar, *pANKA*(PCR); Cinzento: gradiente de alvo *pMTub*(PCR) em misturas de DNA com [(*pANKA* (PCR) não complementar]. de indução de agregação efectuada pela adição de MgCl_2 até força iónica de 0,08 M. Leitura de absorvância efectuada 15 minutos após a adição de electrólito.

Verifica-se um comportamento semelhante ao demonstrado pela sonda PlasmBerg. O comportamento deste sensor pode ser descrito por uma equação polinomial de grau 3 com índices de correlação elevados (0,994). O limite de detecção mínimo deste sistema é de 20 µg/mL, valor ao qual a $r(\text{Abs.}) > 1,1$ e que o limite de quantificação máximo do sistema é de 180 µg/mL, valor ao qual o sistema apresenta um ponto de saturação. Relativamente à presença de alvos não complementares não existe qualquer correlação entre a concentração e a resposta do sensor. Os valores pode ser descritos por $r(\text{Abs.}) = 0,93 \pm 0,02$.

O comportamento do sistema para misturas de ácidos nucleico é semelhante ao comportamento verificado em amostras contendo apenas DNA complementar. O comportamento do sistema de nanossondas na presença de mistura de alvos é sobreponível com os testes de alvos puros, não se verifica alteração dos limites de detecção em amostras com mistura de alvos.

Pelos testes colorimétricos efectuados com as duas Sondas (PlasmBerg e MTub) é possível verificar uma dependência entre a extensão de agregação e a concentração de alvos complementares na amostra testada. Esta dependência é variável, uma vez que a sonda MTub apresenta um intervalo de quantificação mais abrangente [20,180] µg/mL de alvo enquanto a sonda PlasmBerg apresenta um intervalo de [15,65] µg/mL. Estes resultados indicam a possibilidade de modelar o sistema para quantificação com grandes intervalos de resposta, ou para a detecção com limites de detecção mais baixos. O tamanho do oligonucleótido sonda é um factor bastante importante na optimização deste sistema possibilitando a modelação da sensibilidade do sistema. Para oligonucleótidos menores existe um factor de resposta mais abrangente, mas com limites de sensibilidade mais baixos. Para oligonucleótidos maiores existe um intervalo de quantificação mais pequeno, no entanto a sensibilidade do sistema é maior.

Uma vez que o sistema desenvolvido no presente projecto demonstrou ser sensível à extensão de alvos hibridados à sua superfície, foi avaliada a sua capacidade de diferenciação entre alvos 100% complementares e alvos com um *mismatch*.

Nesta perspectiva efectuaram-se testes colorimétricos da sonda MTub com produtos de PCR de *pMTub* (complementar à sonda) e com produtos de PCR de *pKansasii* que apresentam uma mutação pontual na sequência da sonda em estudo.

Neste teste colorimétrico foram alteradas as condições de hibridação e uma vez que se pretende uma maior especificidade do sistema, foi utilizado um tampão de hibridação com uma força iónica mais baixa e com pH=8. Foram, ainda, utilizadas concentrações de DNA alvo elevadas de forma a não existir uma elevada dependência entre a concentração e a resposta do sensor (Figura 10).

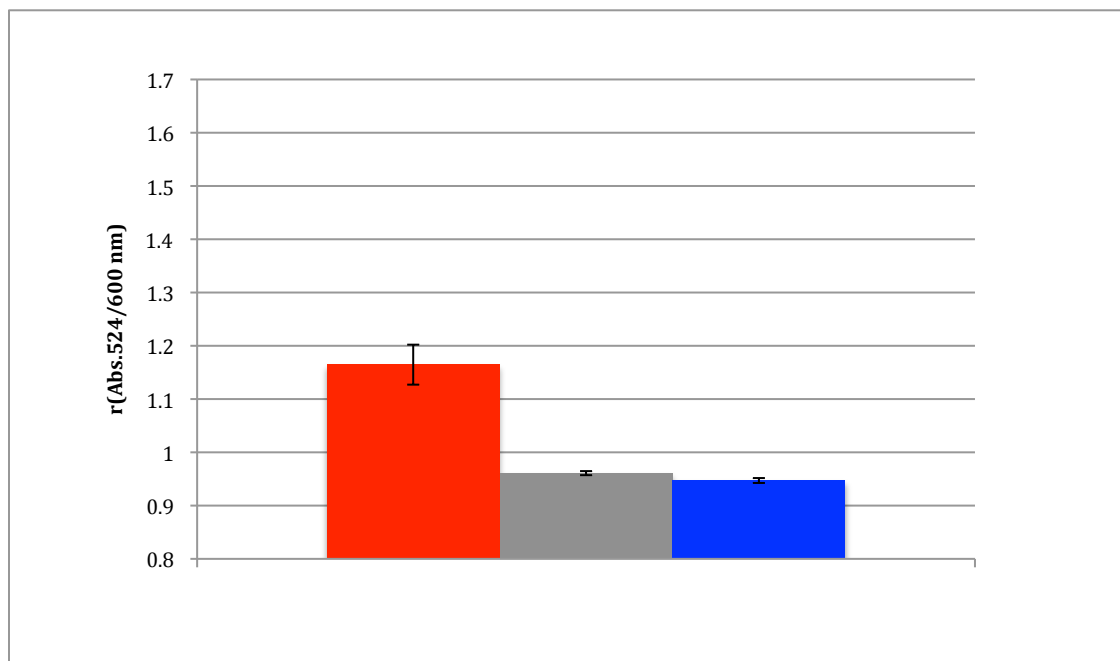


Figura 10: Especificidade de Au-nanossondas: Discriminação entre *M. tuberculosis* e *M. Kansasii*

Sonda MTub: Valores de r(Abs.) para teste efectuados com sonda a 2,5 nM, em tampão fosfato pH=7; Vermelho: alvo complementar *pMTub*(PCR) a 100 µg/mL; Cinzento: *pKA*(PCR) (alvo com missmatch) a 100 µg/mL; Azul: alvo não complementar, *pANKA*(PCR) a 100 µg/mL. Indução de agregação efectuada pela adição de $MgCl_2$ até força iónica de 0,08 M. Leitura de absorvância efectuada 15 minutos após a adição de electrólito.

Os resultados apresentados permitem verificar que o sistema é específico com discriminação de um só nucleótido, permitindo a discriminação entre *Mycobacterium tuberculosis* de *M. Kansasii*. Seria importante analisar a especificidade desta sonda na diferenciação entre *M. tuberculosis* e as restantes espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, constituído por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, e *M. microti*, espécies estas que apresentam patogenicidade em humanos [83,84].

3.4.3 Detecção de mutações pontuais associadas a resistência a antibióticos

Foram desenvolvidas quatro sondas para a detecção de polimorfismos presentes no gene *rpoB* que estão associados a resistência a rifampicina - sondas Rpo516WT e Rpo531WT, sondas com sequências complementar ao gene *wild-type*, e as sondas Rpo516MUT e Rpo531MUT, com sequências complementares ao gene mutado.²

Na perspectiva de otimizar o sistema para a discriminação de mutações pontuais foi avaliada a influência da força iónica na estabilidade cinética do sistema. Foi estudada a cinética de agregação da sonda Rpo516WT, em função da força iónica, na presença de alvo complementar, não complementar, e alvo com *mismatch*. Os resultados representam a variação de $r(\text{Abs.})$ em função da força iónica do meio (Figura 11).

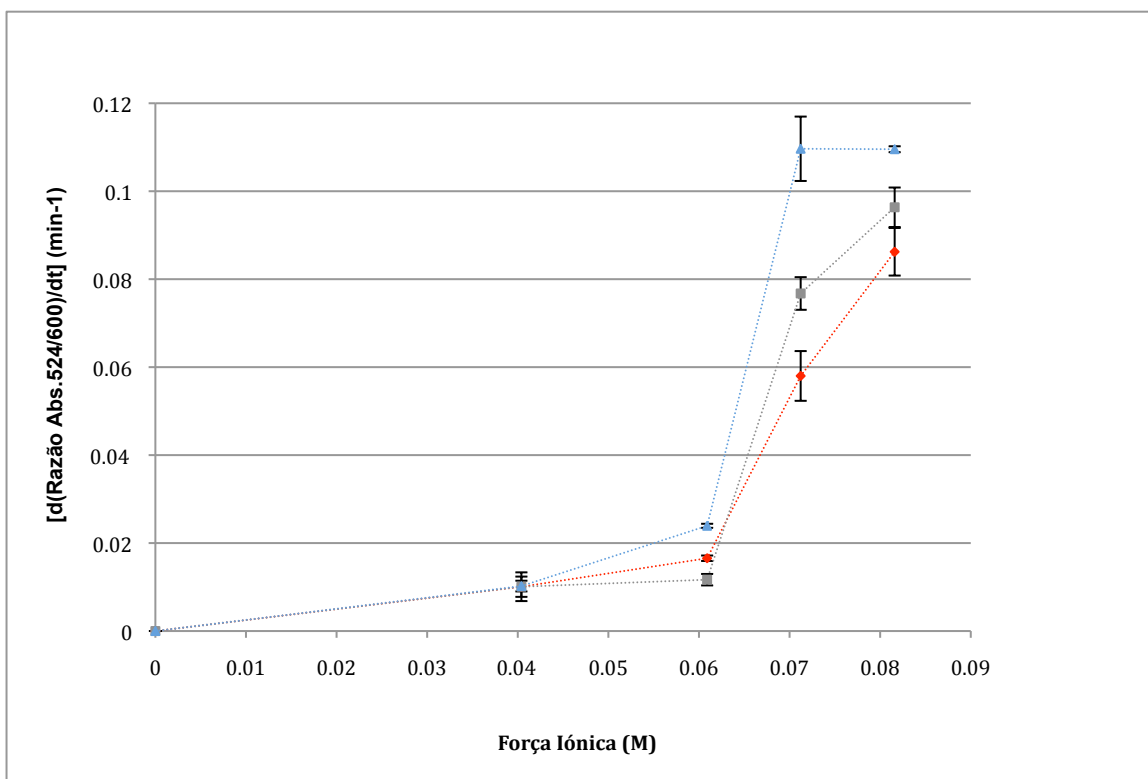


Figura 11: Cinética de Agregação de Au-nanossondas em função da força iónica

Sonda Rpo516WT; Valores de $r(\text{Abs.})$ para teste efectuados com sonda a 2,5 nM, em tampão fosfato pH=8; Vermelho, alvo complementar *pRpoWT*(PCR) a 80 µg/mL; Cinzento, *pRpoA516V*(PCR) (alvo com mismatch) a 80 µg/mL, Azul, alvo não complementar, *pANKA*(PCR) a 80 µg/mL. Indução de agregação efectuada pela adição de gradiente de concentração de MgCl_2 . Estudo cinético efectuado com leituras de absorbância em intervalos de 1 minuto.

² A terminologia 516 e 531 é referente ao códon do gene em que se encontra o polimorfismo que se pretende detectar.

Verifica-se que existe uma relação entre a força iónica e a cinética de agregação. O resultado apresentado é mais uma evidência da estabilização criada pela hibridação de alvos à superfície das nanossondas. No entanto, a presença de alvos com *mismatch* esta estabilização não é tão efectiva, traduzindo-se numa cinética de agregação mais elevada. É possível verificar que para $I=0,07$ M existe a maior diferenciação de velocidade de agregação. Utilizando esta condição foram efectuados testes colorimétricos para verificar a capacidade de distinção entre os diferentes alvos. Os resultados representam a razão de absorvância $r(Abs)$ obtida em função do tempo para alvo complementar, não complementar e *mismatch* para a força iónica de $0,07$ M (Figura 12).

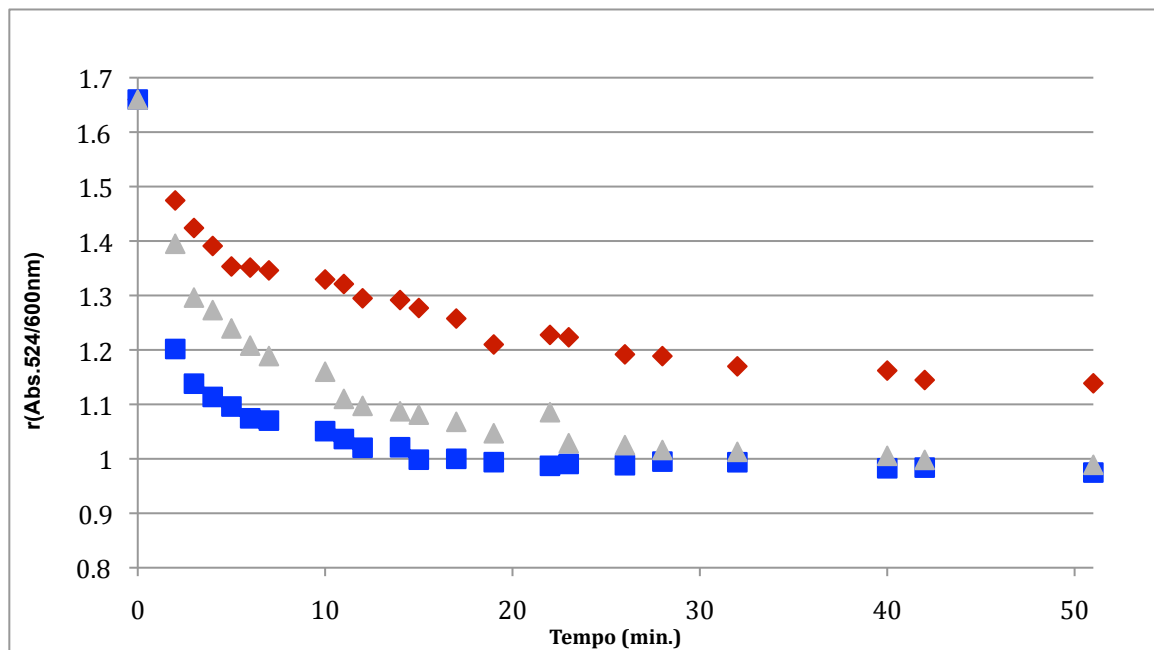


Figura 12: Cinética de agregação de Au-nanossondas, na presença de diferentes alvos.

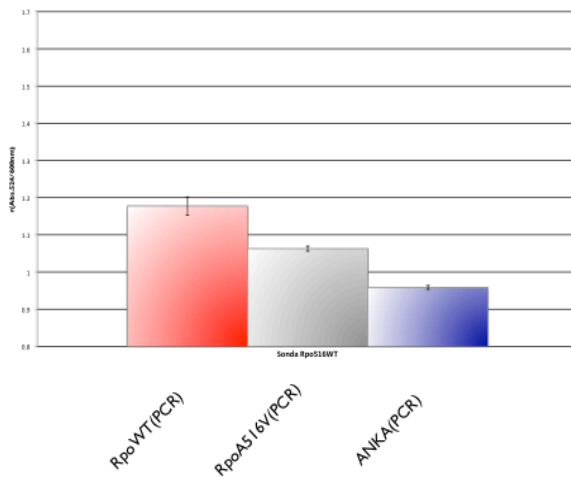
Sonda Rpo516WT; Valores de $r(Abs.)$ para teste efectuados com sonda a $2,5nM$, em tampão fosfato $pH=8$; Vermelho: alvo complementar *pRpoWT*(PCR) a $80 \mu g/mL$; Cinzento: *pRpoA516V*(PCR) (alvo com mismatch) a $80 \mu g/mL$; Azul: alvo não complementar, *pANKA*(PCR) a $80 \mu g/mL$. Indução de agregação efectuada pela adição $MgCl_2$ para força iónica final de $0,07$ M. Leituras de absorvância efectuadas em intervalos de 1 minuto.

Os resultados obtidos permitem verificar a variação da extensão de agregação ao longo do tempo, onde se demonstra uma optimização de discriminação no intervalo [15;30] minutos. Nestas condições é possível obter $r(Abs.) > 1,1$ para o alvo complementar; $1 < r(Abs.) < 1,1$ para o alvo com *mismatch* e $r(Abs.) < 1$ para o alvo não complementar. Para discriminar o alvo com *mismatch* como teste negativo a leitura de absorvância terá

de ser efectuada ao fim de 45 minutos após a adição de electrólito. Verifica-se assim que o sistema possibilita a diferenciação entre alvos complementares e alvos contendo *mismatch*, podendo esta discriminação ser modelada. Mais uma vez verifica-se que o aumento de especificidade do sistema provoca a diminuição da sensibilidade.

Uma vez optimizado o método para a detecção de mutações pontuais, foram efectuados testes colorimétricos com as sondas desenvolvidas. Os testes foram efectuados recorrendo aos pares de sondas Rpo516WT / Rpo516MUT e Rpo531WT / Rpo531MUT com produtos de PCR de *pRPOWT*, *pRpoA516V*, *pRpoS531L* e *pANKA*. Foram utilizadas concentrações de DNA alvo elevadas de forma a não existir uma elevada dependência entre a concentração e a resposta do sensor. A medição de absorvância foi efectuada 20 minutos após a adição de electrólito para se obter diferenciação entre o alvo negativo é o alvo mutado (Figura 13 e 14).

a) Sonda 516WT



b) Sonda 516MUT

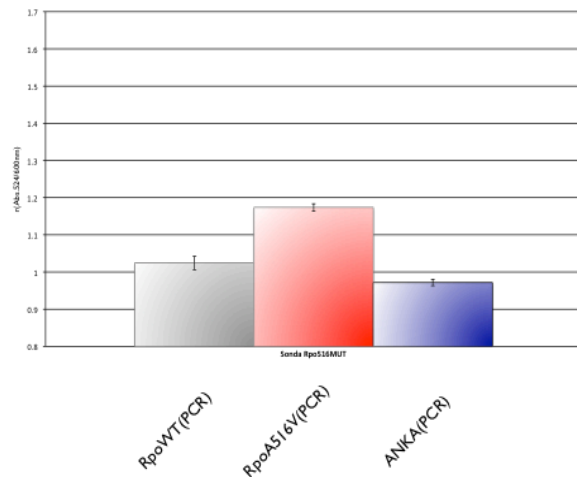
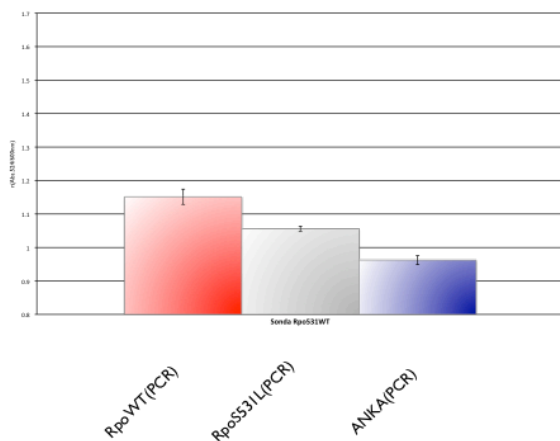


Figura 13: Detecção de mutações que conferem resistência a antibióticos; Sondas Rpo516

Valores de r(Abs.) para teste efectuados com sonda a 2,5 nM, em tampão fosfato pH=8; **a)** Sonda Rpo516WT: Vermelho: alvo complementar *pRpoWT*(PCR) a 80 µg/mL; Cinzento: *pRpoA516V*(PCR) (alvo com mismatch) a 80 ug/mL; Azul: alvo não complementar, *pANKA*(PCR) a 80 µg/mL. **b)** Sonda Rpo516MUT; Vermelho: alvo complementar *pRpoA516V*(PCR) a 80 µg/mL; Cinzento: *pRpoWT*(PCR) (alvo com mismatch) a 80 µg/mL; Azul: alvo não complementar, *pANKA*(PCR) a 80 µg/mL. Indução de agregação efectuada pela adição $MgCl_2$ para força iónica final de 0,18 M. Leituras de absorvância efectuadas 15 minutos após a adição de electrólito.

a) Sonda 531WT



b) Sonda 531MUT

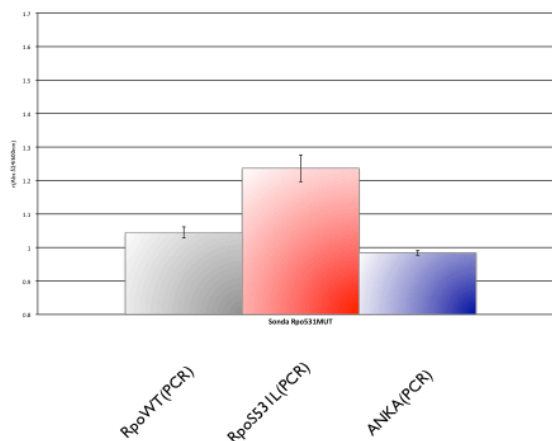


Figura 14: Detecção de mutações que conferem resistência a antibióticos; Sondas Rpo531

Valores de $r(\text{Abs.})$ para teste efectuados com sonda a 2,5 nM, em tampão fosfato pH=8; **a)** Sonda Rpo531WT; Vermelho: alvo complementar $pRpoWT(\text{PCR})$ a 80 $\mu\text{g/mL}$; Cinzento: $pRpos531L(\text{PCR})$ (alvo com *mismatch*) a 80 $\mu\text{g/mL}$; Azul: alvo não complementar, $pANKA(\text{PCR})$ a 80 $\mu\text{g/mL}$. **b)** Sonda Rpo531MUT; Vermelho: alvo complementar $pRpoS531L(\text{PCR})$ a 80 $\mu\text{g/mL}$; Cinzento: $pRpoWT(\text{PCR})$ (alvo com *mismatch*) a 80 $\mu\text{g/mL}$; Azul: alvo não complementar, $pANKA(\text{PCR})$ a 80 $\mu\text{g/mL}$. Indução de agregação efectuada pela adição MgCl_2 para força iónica final de 0,18 M. Leituras de absorvância efectuadas 15 minutos após a adição de electrólito.

Os resultados obtidos permitem verificar que o sistema consegue detectar mutações pontuais em ambas as regiões em estudo. As sonda Rpo516WT e Rpo531WT apresentam resultado positivo para o produto de PCR de $pRpoWT$ ($r(\text{Abs.}) > 1,1$); resultado na zona cinzenta para os produtos de PCR $pRpoA516V$ e $pRpoS531L$ respectivamente ($1 < r(\text{Abs.}) < 1,1$) e resultado negativo para o produto de PCR de $pANKA$ ($r(\text{Abs.}) < 1$). A validação do resultado é obtida pela análise dos resultados das sondas Rpo516MUT e Rpo531MUT que apresentam resultado positivo para o produto de PCR de $pRpoA516V$ e $pRpoS531L$ respectivamente ($r(\text{Abs.}) > 1,1$); resultado na zona cinzenta para os produtos de PCR $pRpoWT$ ($1 < r(\text{Abs.}) < 1,1$) e resultado negativo para o produto de PCR de $pANKA$ ($r(\text{Abs.}) < 1$).

A metodologia proposta recorre a um par de sondas, no qual uma das sondas é complementar ao alvo *wild-type* e a outra complementar ao alvo mutado. Deste modo existe uma confirmação do resultado, sendo possível retirar efeitos de estabilização inespecífica.

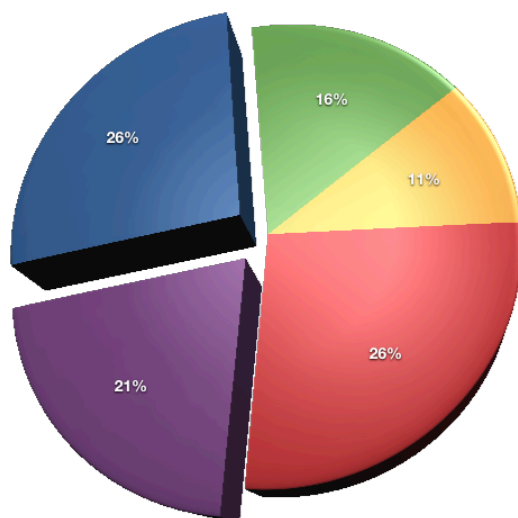
3.6 Validação do sistema de nanossondas

Em todo o desenvolvimento do sistema apresentado recorreu-se a alvos controlados, extraídos e amplificados a partir de clones controlo, utilizando metodologias de purificação dos alvos bastante rigorosas. Uma vez que se pretende desenvolver este sistema como um método de diagnóstico rápido, é importante analisar o comportamento do sistema desenvolvido em amostras biológicas, comparando o resultado com os resultados obtidos por testes de referência no diagnóstico de *M. tuberculosis*.

Foram efectuados testes colorimétricos de 144 amostras previamente testadas com quatro métodos padrão. Dois testes padrão específicos *Acid-Fast bacillus* (AFB) e *Lowenstein-Jensen* (LJ), e dois métodos de amplificação por PCR *Innogenetics line probe assay* (INNO-Lipa PCR) e *INNO-Lipa Nested PCR*.

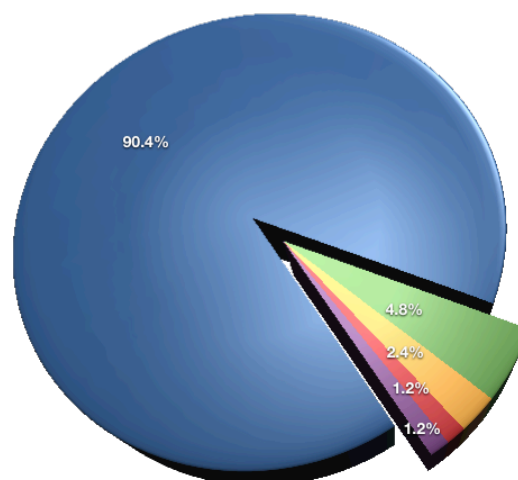
As amostras testadas foram os produtos resultantes das reacções de PCR do método *Lipa Nested PCR*. Estas amostras foram quantificadas, por espectrofotometria de UV e verificou-se que apresentavam concentrações de ácidos nucleicos inferior ao limite de detecção analisado anteriormente para a sonda MTub ([DNA<15ug/mL]. Desta forma foram alteradas as condições de hibridação de forma a permitir a análise. Foi utilizado um tampão de hibridação com força iónica mais elevada - 0,2 M NaCl. Baseado nos resultados obtidos, procedeu-se a uma comparação com os outros métodos (Anexo E e F). Verifica-se que o método utilizado detectou 19 amostras como Positivo, 83 como Negativo e 40 amostras como Indefinido.

a) Resultado Positivo



- Positivo para 4 testes de referência
- Positivo para 3 testes de referência
- Positivo para 2 testes de referência
- Positivo para 1 testes de referência
- Positivo para nenhum teste de referência

b) Resultado Negativo



- Negativo para 4 testes de referência
- Negativo para 3 testes de referência
- Negativo para 2 testes de referência
- Negativo para 1 testes de referência
- Negativo para nenhum testes de referência

Figura 15: Comparação entre métodos de detecção de *M. tuberculosis*:

Correlação entre os dados obtidos pelos 4 métodos de detecção; **a)** comparação entre testes Positivo **b)** comparação entre testes Negativo

O conjunto de resultados obtido, apresenta uma percentagem de resultados falso Positivo (sem correlação com qualquer teste standard) elevada (21%) no entanto os teste foram efectuados com alvos em concentrações no limiar do limite de detecção previamente estabelecido. É ainda de realçar que apesar deste facto apenas 1,2% (1/83) dos resultados são falso Negativo (não apresentam qualquer correlação com resultados dos testes padrão), o que poderá ser uma boa indicação da especificidade do sistema (Figura 15).

4. Conclusão e perspectivas futuras

Ao longo deste estudo pretendeu-se desenvolver e otimizar a metodologia de Au-nanossondas, na detecção de *M. tuberculosis* e *P. berghei*. Nesta perspectiva, analisou-se a influência de parâmetros como a densidade e tamanho de oligonucleótidos sonda na estabilidade das Au-nanossondas resultantes. Verificou-se que a estabilidade final apresentada pelas Au-nanossondas esta correlacionada com o tamanho e quantidade dos oligonucleótidos presentes à sua superfície.

Foi analisada a capacidade de detecção das sondas sintetizadas. Verificou-se que a densidade e o tamanho de oligonucleótidos à superfície das AuNPs é um factor determinante na eficiência de detecção. Outro dos factores que se demonstrou relevante na capacidade de detecção desta metodologia foi a topologia e tamanho da amostra de DNA a analisar. A falta de uma análise sistemática de cada um dos factores que poderão influenciar o comportamento do sistema tornam o desenvolvimento de novas sondas um processo demorado. Seria importante estudar sistematicamente cada um dos factores, possibilitando a compreensão do sistema e a consequente redução de tempo de desenvolvimento e optimização.

O sistema desenvolvido demonstrou ser sensível à concentração de alvo complementar e independente da presença de outros alvos não complementares na amostra. Verificou-se a presença de limites de detecção de [13,65] µg/mL para a sonda PlasmBerg e [20,180] µg/mL para a sonda MTub. O comportamento destes sensores pode ser descrito por uma equação polinomial de grau três com elevados índices de correlação (>0,99) possibilitando assim a quantificação semi-quantitativa de DNA.

Os resultados obtidos demonstram que o sistema é sensível à extensão de hibridação com alvos, o que proporciona a possibilidade de discriminação entre alvos totalmente complementares de alvos contendo mutações. A detecção é conseguida pela leitura de absorvância 15 minutos após a adição de electrólito, no entanto, verificou-se que existe a possibilidade de discriminar o alvo com *mismatch* como “negativo” se a leitura de absorvância for efectuada ao fim de 40 minutos após a adição de electrólito.

Foram desenvolvidos dois pares de sondas específicos para a detecção de mutações pontuais no codão 516 e 531 do gene *rpoB* de *M. tuberculosis*. Utilizou-se uma

metodologia de duas sondas, uma complementar à sequência *wild-type* e a outra complementar à sequência mutada, este método permite realizar um controlo interno de teste. Desta forma, pela análise do conjunto de resultados é possível obter a confirmação da presença da mutação, uma vez que são eliminados os efeitos de estabilização ou destabilização inespecíficos.

Uma vez desenvolvida e otimizada a metodologia para a detecção de alvos, *foram efectuados testes colorimétricos com a sonda MTub, específica para M. tuberculosis*, em 144 amostras previamente testadas com quatro métodos *standart* na detecção deste organismo. Verificou-se que o sistema desenvolvido possibilita a optimização de detecção no limiar de detecção previamente estabelecido, no entanto esta optimização de sensibilidade reduz a especificidade do sistema. Contudo, a perda de especificidade reflecte-se numa crescente percentagem de resultados falso Positivo e Indefinidos, mantendo-se uma baixa percentagem de falsos Negativo de 1,2% (1/83). Este valor apresenta uma grande relevância a nível clínico, uma vez que permite uma elevada confiança na metodologia desenvolvida.

Os resultados obtidos durante o presente projecto são bastante encorajadores para a aplicabilidade da metodologia de Au-nanossondas na detecção de *M. tuberculosis*. Verifica-se uma necessidade de otimizar o protocolo para a purificação das sequências alvo, após o que seria importante testar o sistema novamente com amostras biológicas, comparando os resultados com os testes padrão para o diagnóstico de TB. Será imprescindível fazer uma análise extensiva quanto à especificidade da metodologia de Au-nanossondas, relativamente à discriminação entre *M. tuberculosis* e restantes espécies clinicamente relevantes; e à capacidade de detecção de mutações associadas à resistência a rifamicina. Procedendo-se a ensaios *blind*, com diversas estirpes, e espécies dentro do Género *Mycobacteria*.

5. Bibliografia

1. Goodsell, D.S., *Bionanotechnology: Lessons from Nature*. Wiley-Less, 311:1–8, 2004.
2. Feynman, R., *There's Plenty of Room at the Bottom*. The Vega Science Trust, The American Physical Society at CalTech, California, December 29th 1959.
3. Storhoff, J. J., et al., *One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single base imperfections using gold nanoparticle probes*. J. Am. Chem. Soc., 120(9):1959–1964, 1998.
4. Storhoff, J. J., Mirkin, C.A., *Programmed materials synthesis with DNA*. Chem. Rev.; 99(7):1849–1862, 1999.
5. Storhoff, J. J., Mucic, R.C., Mirkin, C.A. *Strategies for organizing nanoparticles into aggregate structures and functional materials*. J. Clust. Sci.; 8:179–216, 1997.
6. Taton, T. A., Mirkin, C. A., Letsinger, R.L., *Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes*. Science; 289:1757–1760, 2000.
7. Zhang, W.X., *Nanoscale iron particles for environmental remediation: an overview*. J. Nanopart. Res., 5(4):323–332, 2003.
8. Lee, L., Seddon, G., Stephens, F., *Stained Glass*. New York: Crown, vol. 1 1976.
9. Lee, P.C., e Meisel, D., *Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols*. The Journal of Physycal Chemistry, 86:3391-3395, 1982.
10. Hulst, H.C., *Light Scattering by Small Particles*, New York: Dover; 22, 1981.
11. Asano, S., Sato, M., *Light scattering by randomly oriented spheroidal particles*, Appl. Optics; 19:962–974, 1980.
12. Turkevich, J., Garton, G. e Stevenson, P. C., *The colour of Colloidal gold*. Journal of colloid Science; 9:26-35, 1954.
13. Ritchie, R.H., Arakawa, J.J., Cowan, J.J., Hamm, R.M., *Surface-Plasmon Resonance Effect in Grating Diffraction*, Phys. Rev. Lett.; 21:1530 – 1533,1968.

14. Frutos, A. G., Corn, R. M., *Surface Plasmon Resonance of Ultrathin Organic Films*; Corn. Anal. Chem.; 70:449, 1998.
15. Csaki, A., Muller, R., Straube, W., Kæhler, J. M., Fritzsche, W., *DNA monolayer on gold substrates characterized by nanoparticle labeling and scanning force microscopy*, Nucleic Acids Res.; 29:81, 2001.
16. Niemeyer, Angew. *Nanomechanical Devices Based on DNA*, Chem. Int. Ed. 4129, 2002.
17. Caruso, F., *Colloids and Colloid Assemblies: Synthesis, Modification, Organization and Utilization of Colloid Particles*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 3:96-104, 2004.
18. Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, J., Kiely, J., Chem.Soc., *Synthesis and Reactions of Functionalised Gold Nanoparticles*, Chem. Commun.; 1655, 1995.
19. Whetten, R. L., Shafigullin, M. N., Khoury, J. T., Schaaff, T. G., Vezmar, I., Alvarez, M. M., Wilkinson, A., *Crystal structures of molecular gold nanocrystal arrays*, Acc. Chem. Res.; 32:397, 1999.
20. Kang, Y., Kim, K., *Comparative Study of Dodecanethiol-Derivatized Silver Nanoparticles Prepared in One-Phase and Two-Phase Systems*, Langmuir; 14:226, 1998.
21. Goad, D. G. W., M Moskovits. *Colloidal metal in aluminum-oxide*; J. Appl. Phys.; 49:2929, 1978.
22. Despic, A., Parkhutik, V., *Modern Aspects of Electrochemistry*. Plenum Press, New York; 7:2, 1972.
23. Foss, C. A., Hornyak, G. L., Stockert, J. A., Martin. C. R., *Template-Synthesized Nanoscopic Gold Particles: Optical Spectra and the Effects of Particle Size and Shape*, J. Phys. Chem.; 98:2963, 1994.
24. Zande, B. M., Koper, G. J., Lekkerkerker. H. N., *Alignment of Rod-Shaped Gold Particles by Electric Fields*; J. Phys. Chem. B., 103:5754, 1999.
25. Frutos, A. G., Corn, R. M., *Surface Plasmon Resonance of Ultrathin Organic Films*; Corn. Anal. Chem.; 70:449, 1998.
26. El-Sayed, M. A., *Some interesting properties of metal confined in time and nanometer space of diferente shapes*, Accounts of chemical research; 34:257-264, 2001.

27. Jensen, T. R., Schatz, G.C., Van Duyne, R. P., Nanosphere Lithography: Effect of the External Dielectric Medium on the Surface Plasmon Resonance Spectrum of a Periodic Array of Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem.*; 103:2934, 1999.
28. Lee, P. C., e Meisel, D., *Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols*. The Journal of Physycal Chemistry; 86:3391-3395, 1982.
29. Rosi, N. L. e Mirkin, C. A., *Nanostructures in biodiagnostics*. Chemical Reviews; 105:1547-1562, 2005.
30. Rosi, N. L. e Mirkin, C. A., *Nanostructures in biodiagnostics*. Chemical Reviews; 105:1547-1562, 2005.
31. Storhoff, J.J., Lazarides, A.A., Mucic, R.C., Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., Schatz, G.C., *What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies?* Journal of American Chemical Society; 122:4640-4650, 2000.
32. Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C., Storhoff, J. J., *A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials*. Nature; 382:607-609, 1996.
33. Baptista, P., Doria, G., Henriques, D., Franco, R., *Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles*. Journal of biotechnology; 119:111-117, 2005.
34. Baptista, P. V., Koziol-Montewka, M., Paluch-Oles, J., Doria, G., Franco, R., *Gold nanoparticles-probe-based assay for rapid and direct detection of mycobacterium tuberculosis by in vitro transcription*. Clin. Chem.; 29:1-29, 2006.
35. Doria, G., Franco, R., Baptista, P., *Nanodiagnostics: Fast colorimetric Method for single Nucleotide Polymorphism/Mutation Detection*. IET Nanobiotechnology; 1(4):53-57, 2007.
36. Sato, K., Onoguchi, M., Sato, Y., Hosokawa, K., Maeda, M., *Non-cross-linking gold nanoparticles aggregation for sensitive detection of single-nucleotide polimorphisms: optimization of the particle diameter*. Analitical Biochemistry; 350:162-164, 2006.

37. Sato, K., Hosokawa, K., Maeda, M., *Rapid aggregation of gold nanoparticles induced by non-cross-linking DNA hybridization*. Journal of American Chemistry Society; 125:8102-8103, 2003.
38. Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., Raviglione, M.C., *Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country*; journal of the American Medical Association, 282:677–86, 1999.
39. World Health Organization. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance, 2002-2007. *Anti-tuberculosis drug resistance in the world: report No. 4*. Geneva, Switzerland: WHO, 2008.
40. Espinal, M. A., Laszlo, A., Simonsen, L., *Global trends in resistance to antituberculosis drugs*, N. Engl. J. Med.; 344:294–1303, 2001.
41. Papazoglou, E. S., Parthasarathy, A., *Bionanotechnology, School of Biomedical Engineering Drexel University*; 1:1-14, 2006.
42. Liu, X., Atwater, M., Wang, J., Huo, Q., *Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands*. Colloids and Surfaces, Biointerfaces; 58:3-7, 2007.
43. World Health Organization. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance, 2002-2007. *Anti-tuberculosis drug resistance in the world: report No. 4*. Geneva, Switzerland: WHO, 2008.
44. Zhang, Y., Telenti, A., *Genetics of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*; Washington, ASM Press; 1:235–254, 2000.
45. Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M.J., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T., *Detection of rifampicin resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis*, Lancet; 341:647–650, 1993.
46. Heep, M., Brandstatter, B., Rieger, U., Lehn, N., Richter, E., Rüscher-Gerdes, S., Niemann, S. *Frequency of rpoB mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates*. J. Clin. Microbiol., 39:107–110, 2001.
47. Kapur, V., Li, L. L., Hamrick, M. R., Plikaytis, B. B., *Rapid Mycobacterium species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis by automated DNA sequencing*. Arch Pathol Lab. Med.; 119:131–138, 1995.
48. Bergman, J. S., Woods, G. L., *Clinical evaluation of the Roche Amplicor PCR*

- Mycobacterium tuberculosis* test for detection of *M. tuberculosis* in respiratory specimens, J. Clin. Microbiol.; 34:1083, 1996.
49. Stauffer, F., Mutschlechner, R., Hasenberger, P., Stadlbauer, S., Schinko, H., *Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical specimens by a commercial polymerase chain reaction kit.* Eur J. Clin. Microbiol.; 14:1046–51, 1995.
 50. Tevere, V. J., Hewitt, P. L., Dare, A., Hocknell, P., Keen, A., Spadoro, J. P., Young, K. K. Y., *Detection of Mycobacterium tuberculosis by PCR amplification with pan-Mycobacterium primers and hybridization to an M. tuberculosis-specific probe.* J. Clin. Microbiol.; 34:918, 1996.
 51. Chin, D. P., Yajko, D. M., Hadley, W. K., Sanders, C. A., Nassos, P. S., Mandej, J. J., Hopewell, P. C., *Clinical utility of a commercial test based on the polymerase chain reaction for detecting Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens,* J. Respir. Crit. Care Med.; 151:1872, 1995.
 52. Zahrani, A. L., Al Jahdali, K., Poirier, H., *Accuracy and utility of commercially available amplification and serologic tests for the diagnosis of minimal pulmonary tuberculosis.* J. Respir. Crit. Care Med.; 162:1323, 2000.
 53. Kwok, D. Y., Davis, G. R., Whitefield, K. M., Chapelle, H. L., DiMichele, L. J., Gingeras, T. R., *Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format.* Proc. Natl. Acad. Sci USA; 86:1173, 1989.
 54. Lee, H., Park, H. J., Cho, S. N., Bai, G. H., Kim, S. J., *Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the rpoB gene,* J. Clin. Microbiol.; 38: 2966, 2000.
 55. Magalhães, V. D., de Melo Azevedo, F. P., Pasternak J., Martino M. D., *Reliability of hsp65-RFLP analysis for identification of Mycobacterium species in cultured strains and clinical specimens,* J. Microbiol. Methods; 49:295-300, 2002.
 56. Chin, D. P., Yajko, D. M., Hadley, W. K., Sanders, C. A., Nassos, P. S., Mandej, J. J., Hopewell, P. C., *Clinical utility of a commercial test based on the polymerase chain reaction for detecting Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens.* J. Respir. Crit. Care Med.; 151:1872, 1995.
 57. Al Zahrani, K., Al Jahdali, H., Poirier, L., Rene, P., Gennaro, M.L., Menzies, D., *Accuracy and utility of commercially available amplification and serologic*

- tests for the diagnosis of minimal pulmonary tuberculosis. J. Respir. Crit. Care Med.*; 162:1323, 2000.
58. Gamboa, F., Fernandez, G., Padilla, E., Manterola, J. M., Lonca, J., Cardona, P. J., *Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe amplified Mycobacterium tuberculosis Direct test, for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and nonrespiratory specimens, J. Clin. Microbiol.*; 36:684, 1998.
 59. Smith, M. B., Bergmann, J. S., Onoroto, M., Mathews, G., Woods, G. L., *Evaluation of the enhanced amplified Mycobacterium tuberculosis direct test for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens. Arch Pathol Lab. Med.*; 123:1101, 1999.
 60. Scarparo, C., Piccoli, P., Rigon, A., Ruggiero, G., Scagnelli, M., Piersimoni, C., *Comparison of enhanced Mycobacterium tuberculosis amplified direct test with Cobas Amplicor Mycobacterium tuberculosis assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory and extrapulmonary specimens, J. Clin. Microbiol.*; 38:1559, 2000.
 61. De Beenhouwer, H., Lhiang, Z., Jannes, G., Mijs, W., Machtelinckx, L., Rossau, R., *Rapid detection of rifampin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and lineprobe assay. Tuber. Lung. Dis.*; 76:425, 1995.
 62. Hirano, K., Abe, C., Takahashi, M., *Mutations in the rpoB gene of rifampin resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay, J. Clin. Microbiol.*; 37:2663, 1999.
 63. Traore, H., Fissette, K., Bastian, I., Devleeschouwer, M., Portaels, F., *Detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from diverse countries by commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance, Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*; 4:481, 2000.
 64. Soo, P. C., Horng, Y. T., Chang, K. C., Wang, J. Y., Hsueh, P. R., Chuang C. Y., Lu, C. C., Lai, H. C., *A simple gold nanoparticle probes assay for identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis complex from clinical specimens; Molecular and cellular probes*; 5:240, 2009.
 65. Liandris, E., Gazouli, M., Andreadou, M., Comor, M., Abazovic, N., Sechi, L. A., Ikononopoulos, J., *Direct detection of unamplified DNA from pathogenic*

- mycobacteria using DNA-derivatized gold nanoparticles*. J. Microbiol. Methods.; 78(3): 260-4, 2009.
66. Hoffman, S., *Save the children*, Nature; 430(7002):940–941, 2004.
 67. World Health Organization. *The World Malaria 2008*, WHO/HTM/GMP/1, ISBN 9789241563697, 2008.
 68. Bojang, K. A., Obaro, S., Morison, L. A., Greenwood, B. M., *A prospective evaluation of a clinical algorithm for the diagnosis of malaria in Gambian children*. Trop. Med. Int. Health.; 5(4):231–236, 2000.
 69. Chandramohan, D., Jaffar, S., Greenwood, B., *Use of clinical algorithms for diagnosing malaria*. Trop. Med. Int. Health.; 7(1):45–52, 2002.
 70. Moody, A., *Rapid diagnostic tests for malaria parasites*. Clin. Microbiol. Rev.; 15(1):66–78, 2002.
 71. Makler, M. T., Palmer, C. J., Ager, A. L., *A review of practical techniques for the diagnosis of malaria*. Ann. Trop. Med. Parasit.; 92(4):419–433, 1998.
 72. Coleman, R. E., Maneechai, N., Rachaphaew, N., Kumpitak, C., Miller, R. S., Soyseng, V., Thimasarn, K., Sattabongkot, J., *Comparison of field and expert laboratory microscopic for active surveillance for asymptomatic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in western Thailand*. Am. J. Trop. Med. Hyg.; 67(2):141–144, 2002.
 73. Hanscheid, T., Valadas, E., Grobusch, M. P., *Automated malaria diagnosis using pigment detection*, Parasitol. Today; 16(12):549–551, 2000.
 74. van Doorn, H.R., Hofwegen, H., Koelewijn, R., Gilis, H., Peek, R., et al., *Use of rapid dipstick and latex agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of Amebic Liver Abscess, Amebic Colitis and Entamoeba histolytica Cyst Passage*, J. Clin. Microbiol.; 43(9):4801–4806, 2005.
 75. Banffer, J. R., van Zwol-Saarloos, J. A., Broere, L. J., *Evaluation of a commercial latex agglutination test for rapid detection of salmonella in fecal samples*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.; 12:633–636, 1993.
 76. Jackson, C., Glass, M. B., Ari, M. D., Braggs, S. L., *Evaluation of a commercial latex agglutination assay for serological diagnosis of leptospirosis*. J. Clin. Microbiol.; 44(5):1853–1855, 2006.

77. Krzych, U., Schwenk, R., Guebre-Xabier, M., Sun, P., Palmer, D., White, K., *The role of intra-hepatic lymphocytes in mediating protective immunity induced by attenuated Plasmodium berghei sporozoites*. Immunol. Rev.; 174:123–134, 2000.
78. Langhorne, J., Mombaerts, P., Tonegawa, S and T cells in the immune response to the erythrocytic stages of malaria in mice, Int. Immunol.; 7:1005–1011, 1995.
79. Hirunpetcharat, C., Good, M. F. *Deletion of Plasmodium berghei specific CD4 T cells adoptively transferred into recipient mice after challenge with homologous parasite*, Proc. Natl. Acad. SciUSA; 95:1715–1720, 1998.
80. Rougemont, M., Saanen, M., Sahli, R., *Detection of Four Plasmodium Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays*, Journal of Clinical Microbiology; 12(42):5636-5643, 2004.
81. Hurst, S. J., Abigail, K. R., Lytton-Jean, Mirkin, C. A., Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes, *Analitical Chemistry*; 78(24): 8313–8318, 2006.
82. Pellegrino, T., Sperling, R. A., Alivisatos, A. P., Parak, W. J., Gel Electrophoresis of Gold-DNA Nanoconjugates, Journal of Biomedicine and Biotechnology; 10:1155, 2007.
83. Niemann, S., Kubica, T., Bange, F.C., et al. The species Mycobacterium africanum in the light of new molecular markers. J Clin Microbiol; 42(9):3958–3962, 2004.
84. van Soolingen, D., van der Zanden, A.G., Haas P.E., et al. Diagnosis of Mycobacterium microti infections among humans by using novel genetic markers. J. Clin. Microbiol.; 36(7):1840–1845,1998.

Anexos:

Anexo A: Sequência de clones *template*

Sequências nucleotídicas de pMTUB, pRpoWT, pRpoA516V, pRpoS531L, pMKA e pANKA, e vetores utilizados.

Clone	Vector	Sequência Nucleotídica clonada (5'-3')
pMTUB	pJet	GCCTGAACACCATATCCATCCGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGGGTTGTTCTGGTCCATGAATTGGCTCG CTGGCTGGTGCCGAAGAACTCCTTGATCGCGGCGACACCGGCCGGATGCTGATCAACGCTGCGGGTGATCC CTCCACGTCTGGGTGGTTCATCCGCTCCGGACACCGGCTCCATCCGCAACATGCCGACCCGGATCTGGTTTG GATCAGCTCGCCGACCGTACGACGGCGCGGTTGCCGAAGTGATCTTTCTAGAAGATCTCTACAATATTCTCG CTGC
pMKA	pJet	TGTTCTGGTCATGAAGTGGGAGAGCTGGCTGGTGCCGAAGAACTCCTTGATGGCGGCGACACCGGGCGGATGT GATCAGTGTCTCGGGCGTGATCGCCTCGACGTCTGAGTGGTCATCCGTTCCCGGACACCGGCTCCATCCTCA CATGCCGACCCGGATCTGGTTCTGGATCAGCTCGCCGACGGTACGCAACCGGCGGTTGCCGAAGTGATCTTG TGAAAACTCGAGCCATCCGGATGGATATGGTGTTCAGGCACAAGTGTAAAGCAGTTGATTTTACTACTATGAT
pANKA	PUC-18	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAAACGACCGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCC TCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCCGCCCTTAAGCATTAAATAAAGCGA ATACATCCTTACTAGAAAAAGGCATGTCTGTAACGCAAGAAATCATAATGAAAAAGGCAAAAGGTAACCAATTG ATTAATCAATATGCCACATAAACGTCAAAACCAATCTCCAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAG TGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG
pRpoWT	pCR4-TOPO	TACGGTCGGCGAGCTGATCCAAAACAGATCCGGGTCGGCATGTGCGGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCGG ATGACCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACGCGAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCCGCCGATCA AGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAAGCAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAG CGCCGACTGTGCGGCGTGGGGCCCGGGTCTGTACAGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCGACGTGCAC CCGTGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCCAACATCGGTCTGATCGGCTCGCTGTC GGGTACGCGCGGGTCAACCCGTTCCGGTTTCATCGAAACGCCGTACCGC
pRpoA516V	pCR4-TOPO	TACGGTCGGCGAGCTGATCCAAAACAGATCCGGGTCGGCATGTGCGGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCGG ATGACCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACGCGAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCCGCCGATCA AGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGTCCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAG CGCCGACTGTGCGGCGTGGGGCCCGGGTCTGTACAGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCGACGTGCAC CCGTGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCCAACATCGGTCTGATCGGCTCGCTGTC GGGTACGCGCGGGTCAACCCGTTCCGGTTTCATCGAAACGCCGTACCGC
pRpoS531L	pCR4-TOPO	TACGGTCGGCGAGCTGATCCAAAACAGATCCGGGTCGGCATGTGCGGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCGG ATGACCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACGCGAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCCGCCGATCA AGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAAGCAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAG CGCCGACTGTTGGCGCTGGGGCCCGGGTCTGTACAGTGAGCGTGCCGGGCTGGAGGTCCGCGACGTGCAC CCGTGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCCAACATCGGTCTGATCGGCTCGCTGTC GGGTACGCGCGGGTCAACCCGTTCCGGTTTCATCGAAACGCCGTACCGC

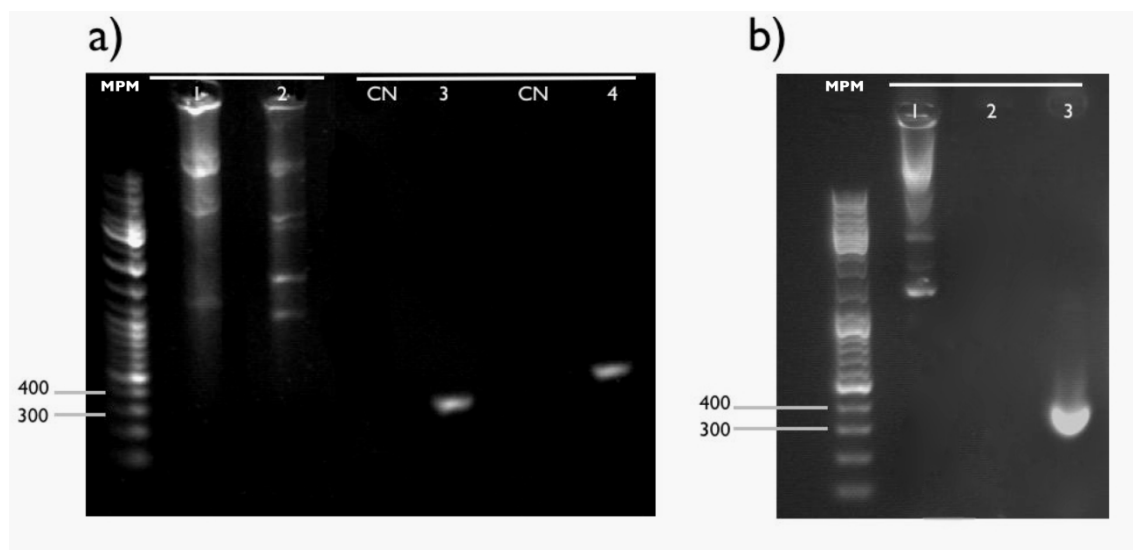


Figura 16: Electroforese do DNA molde e produtos de PCR

Electroforese (80V, 45 min) em gel de agarose (1%; TBE 1X, GelRed 0,5X), visualização em transiluminador de luz UV; MPM) marcador de peso molecular; a) 1) produto de extracção plasmídica de pMTub; 2) produto de extracção plasmídica de pANKA; 3) Produto de amplificação de pMTub por PCR; 4)) Produto de amplificação de pANKA por PCR; CN) controlo de reacção de PCR. b) 1) produto de extracção plasmídica de pKa; 2) controlo de reacção de amplificação de pKa por PCR; 3) Produto de amplificação de pKa por PCR.

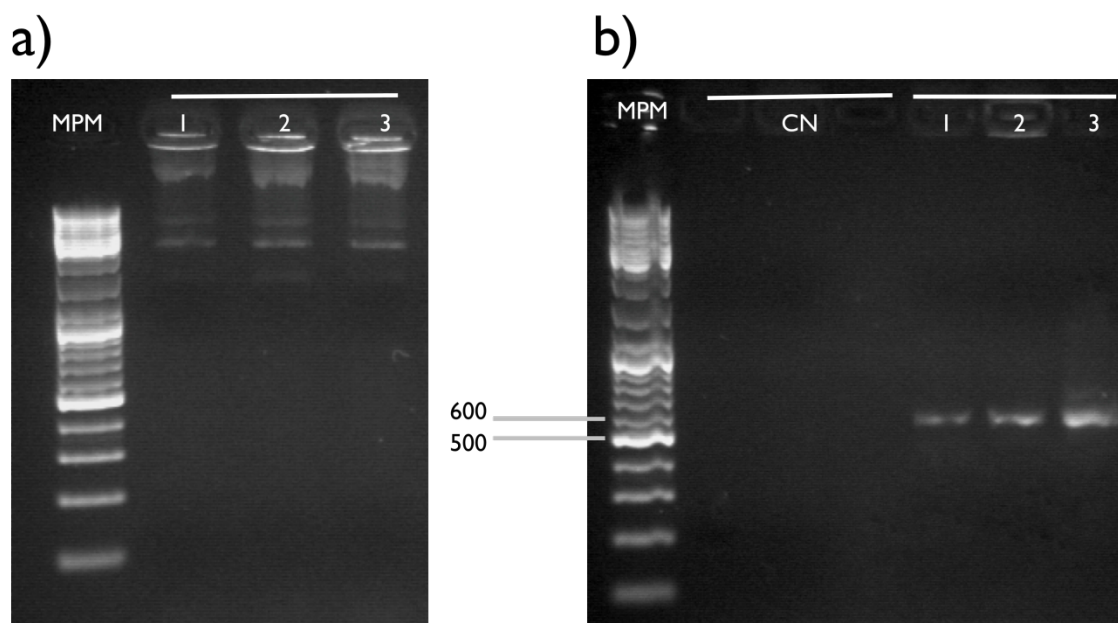


Figura 17: Electroforese do DNA molde e produtos de PCR

Electroforese (80V, 45 min) em gel de agarose (1%; TBE 1X, GelRed 0,5X), visualização em transiluminador de luz UV. MPM) marcador de peso molecular; a) 1) produto de extracção plasmídica de RpoWT; 2) produto de extracção plasmídica de RpoA516V; 3) produto de extracção plasmídica de RpoS531L; b) 1) produto de Amplificação de RpoWT por PCR; 2) produto de amplificação de RpoA516V por PCR; 3) produto de amplificação de RpoS531L por PCR; CN) Controlos de reacção de PCR.

Anexo B: Fragmentação de plasmídeos por ultra-sons

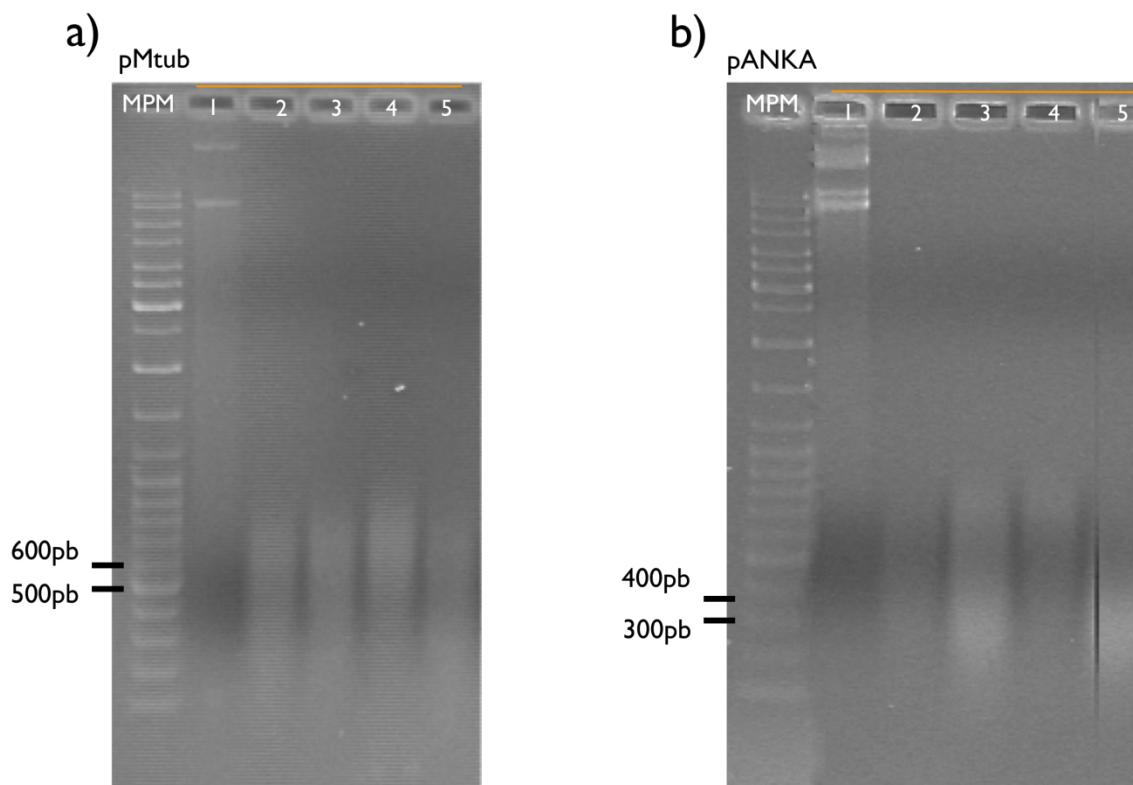


Figura 18: Electroforese de Plasmídeos Fragmentados

Electroforese (80V, 45 min) em gel de agarose (1%; TBE 1X, GelRed 0,5X), visualização em transiluminador de luz UV. MPM) marcador de peso molecular; a) 1) produto de extracção plasmídica de pMTub; 2,3,4,5) produtos da fragmentação de pMTub em sono reactor b) 1) produto de extracção plasmídica de pANKA; 2,3,4,5) produtos da fragmentação de PANKA em sono reactor.

Anexo C: Testes de *spiking* sonda PlasmBerg

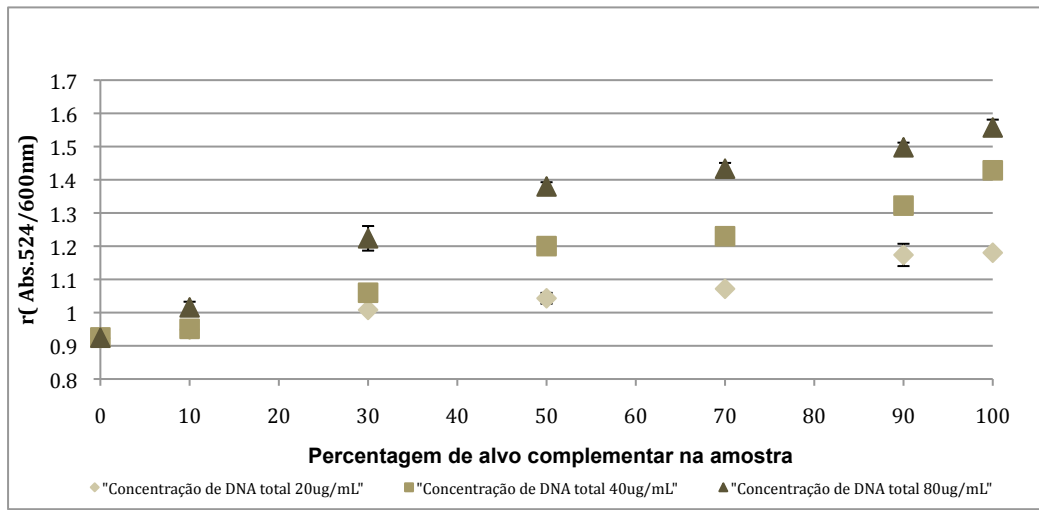


Figura1

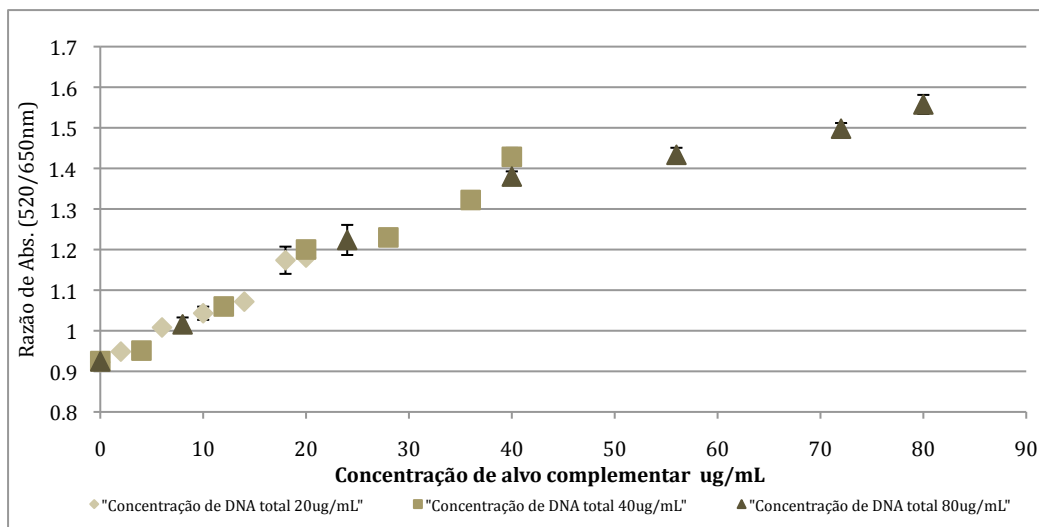


Figura2

Testes colorimétricos de sonda PlasmBerg na presença de misturas de ácidos nucleicos.

Quantificação de alvo em misturas de DNA com sonda PlasmBerg: Valores de $r(\text{Abs.})$ para teste efectuados com sonda a 2,5 nM, em tampão fosfato pH=7. Foram utilizadas soluções com três concentrações finais de DNA total de 20, 40 e 80 µg/mL. Para cada uma das concentrações, foram utilizadas percentagens crescentes de alvo complementar [pANKA(PCR)] (10, 30, 50, 70, 90 e 100%). Figura 1: resultados obtidos em função da percentagem de alvo nas amostras testadas. Figura 2: Resultados obtidos em função da concentração de alvo complementar nas amostras testadas.

Anexo D: Testes de *spiking* sonda MTub

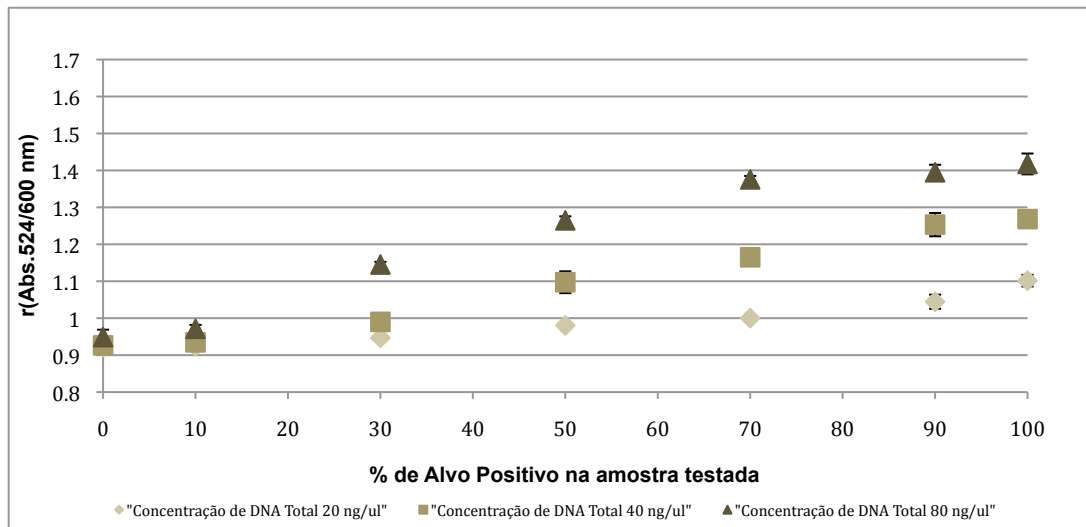


Figura1

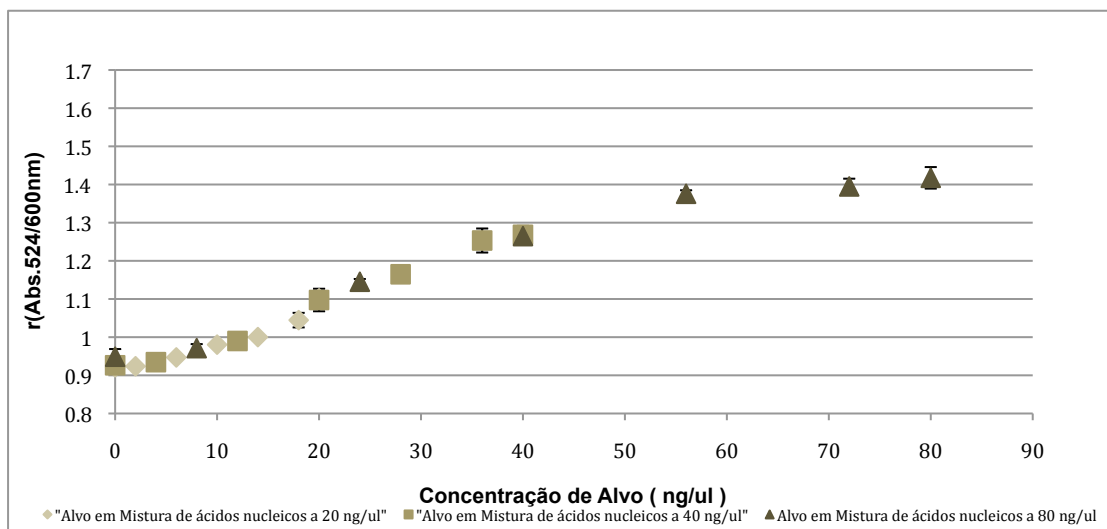


Figura 2

Testes colorimétricos de sonda MTub na presença de misturas de ácidos nucleicos.

Quantificação de alvo em misturas de DNA com sonda PlasmBerg: Valores de $r(\text{Abs.})$ para teste efectuados com sonda a 2,5 nM, em tampão fosfato pH=7. Foram utilizadas soluções com três concentrações finais de DNA total de 20,40 e 80 $\mu\text{g/mL}$. Para cada uma das concentrações foram utilizadas percentagens crescentes de alvo complementar [pMTub(PCR)] (10, 30, 50, 70, 90 e 100%). Figura 1: Resultados obtidos em função da percentagem de alvo nas amostras testadas. Figura 2: Resultados obtidos em função da concentração de alvo complementar nas amostras testadas.

Anexo E: Testes de amostras biológicas para a presença de *M. tuberculosis* com quatro métodos de diagnóstico

Resultados de testes colorimétricos da Sonda MTub em 144 amostras biológicas previamente testadas para quatro testes padrão: Testes em meio de Cultura (AFB; LJ) testes Baseados em PCR [Lipa(PCR); Lipa (Nested PCR)].

Nº de Amostra	Referencia do Paciente	Teste AFB	Teste em Cultura LJ	LIPA (PCR)	LIPA (NESTED PCR)	Au-NP (Sonda Mtub)	r(Abs 524/600nm)	Erro
1	1616	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	1.134493577	0.02677831
2	1649	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.997504048	0.01304098
3	1651	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.969772414	0.02256305
4	1652	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.974391775	0.031519083
5	1653	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.088591768	0.024822483
6	1654	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.980984137	0.02607874
7	1656	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.980705798	0.004206391
8	1657	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.98769057	0.012239831
9	1658	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	1.16077649	0.030929964
10	1659	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.989011242	0.006694909
11	1660	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.000290541	0.022985326
12	1661	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.998933492	0.007075598
13	1662	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.98470061	0.007393671
14	1663	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.984460157	0.025707933
15	1674	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.95771881	0.004069345
16	1675	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	1.13312133	0.065636949
17	1676	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.976460765	0.009823075
18	1677	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.991073553	0.005430886
19	1684	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.953075703	0.01350089
20	1686	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.955433174	0.002886453
21	1687	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.945502502	0.005844887
22	1688	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Zona Cinzenta	1.055989743	0.003451336
23	1692	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	1.113272336	0.016223933
24	1701	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.993271367	0.001642642
25	1702	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Zona Cinzenta	1.090439208	0.001843925
26	1707	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.037274559	0.014635488
27	1710	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	0.994101706	0.005322439
28	1712	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.982515344	0.006759681
29	1715	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.984270282	0.01569529
30	1716	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Zona Cinzenta	1.076051712	0.00770062
31	1718	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.970964398	0.008870044
32	1721	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.997587027	0.007637666
33	1722	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.971242373	0.008532524
34	1723	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.99301926	0.001458108
35	1734	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.999512085	0.003315715
36	1737	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.07338501	0.004467438
37	1739	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.000430031	0.040552027
38	1740	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.963035978	0.016027628
39	1741	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.980056105	0.013688157
40	1744	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	0.997952787	0.019292946
41	1748	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Zona Cinzenta	1.031772451	0.005300446
42	1749	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.961113191	0.02173725

43	1750	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.940050519	0.006306755
44	1752	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	1.111362089	0.085656012
45	1753	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.997037381	0.015916383
46	1754	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.016193595	0.00364939
47	1756	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Zona Cinzenta	1.041429429	0.017038182
48	1757	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Zona Cinzenta	1.066092514	0.017948103
49	1758	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.955127894	0.011140557
50	1759	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.989634593	0.031227425
51	1762	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	1.102117856	0.035861175
52	1765	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Zona Cinzenta	1.081283808	0.021638107
53	1766	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	1.104379894	0.067220032
54	1767	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.939788789	0.008632728
55	1772	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.930964295	0.001045474
56	1773	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.945725761	0.01588829
57	1775	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.991857172	0.017075103
58	1776	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.95337134	0.02784048
59	1777	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.969725301	0.013858865
60	1778	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.962458662	0.025611352
61	1800	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.958599471	0.001890253
62	1802	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	0.968125896	0.021637444
63	1804	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.976292349	0.009460148
64	1805	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	0.991390741	0.018650456
65	1806	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Zona Cinzenta	1.090504192	0.028147762
66	1807	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.967782155	0.007892714
67	1808	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Zona Cinzenta	1.075252944	0.01807938
68	1810	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.991169866	0.02092102
69	1811	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.935326003	0.006759137
70	1816	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.973548239	0.055039585
71	1818	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.934893834	0.014284812
72	1820	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.949610142	0.011966236
73	1845	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.903988014	0.012976337
74	1848	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Zona Cinzenta	1.023987278	0.012228536
75	1849	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.9697764	0.007478024
76	1853	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.967477367	0.012341178
77	1856	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Zona Cinzenta	1.081008634	0.048832593
78	1860	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Zona Cinzenta	1.058850835	0.005302426
79	1861	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	1.157095457	0.007268102
80	1864	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	0.966512395	0.021685734
81	1865	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Zona Cinzenta	1.020375808	0.022293259
82	1868	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Zona Cinzenta	1.023042112	0.005483707
83	1869	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Zona Cinzenta	1.085146431	0.01336889
84	1871	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.991375843	0.005180492
85	1873	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.095800778	0.006610946
86	1875	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.993942853	0.009247272
87	1879	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.985770714	0.009812912
88	1881	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.985178782	0.004959351
89	1882	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.981113929	0.010942241
90	1884	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.986953859	0.003133591
91	1886	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.986720841	0.013383443
92	1887	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.989839982	0.013186161
93	1893	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	1.123425678	0.01974256

94	1896	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.029057889	0.017643863
95	1900	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.987218629	0.005291391
96	1902	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.077205492	0.025270012
97	1905	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	1.130727532	0.041064802
98	1906	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.980221358	0.004533841
99	1907	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.04483783	0.016198955
100	1908	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Zona Cinzenta	1.041363829	0.007307408
101	1909	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	0.990715686	0.007833634
102	1910	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	1.112378955	0.005495635
103	1911	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.990746945	0.003545697
104	1913	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.990009569	0.00907763
105	1915	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Zona Cinzenta	1.088959512	0.021567782
106	1916	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.961189364	0.001738867
107	1918	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Zona Cinzenta	1.088181051	0.007731867
108	1919	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	1.117088196	0.028976677
109	1920	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.003847826	0.01138603
110	1921	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.085495927	0.034938955
111	1926	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.962523384	0.010945144
112	1927	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Zona Cinzenta	1.037589754	0.025476023
113	1938	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	0.966733775	0.014773964
114	1939	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.961189364	0.001738867
115	1940	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Zona Cinzenta	1.077098868	0.005772829
116	1945	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.953224383	0.005062769
117	1952	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	1.123939157	0.054393527
118	1955	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	0.970802679	0.007670801
119	1958	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	1.111217858	0.014687441
120	1960	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.03735339	0.003410293
121	1961	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Zona Cinzenta	1.057434931	0.008689689
122	1962	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.955696043	0.009486104
123	1973	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.957564742	0.014412589
124	1974	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.978523183	0.004744153
125	1981	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.017779005	0.005439026
126	1983	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	1.272366625	0.084588946
127	1984	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	1.113607267	0.023056283
128	1986	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.955509417	0.005948458
129	1989	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.994823353	0.0109999
130	1991	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Zona Cinzenta	1.057425383	0.003639776
131	1992	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.990843733	0.004468466
132	1993	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.995326331	0.002841952
133	1994	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	1.174721367	0.008862646
134	1995	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.030806872	0.008397858
135	1997	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.036238539	0.005744864
136	1998	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.977451686	0.013444048
137	2003	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.955276996	0.008333453
138	2005	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Zona Cinzenta	1.061680454	0.003615159
139	2010	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.972101761	0.002505372
140	2011	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	1.12075062	0.008304017
141	2018	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Zona Cinzenta	1.03138357	0.019951899
142	2019	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.993692057	0.001480358
143	2020	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0.957451686	0.00665744
144	2024	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	0.981201379	0.013357525

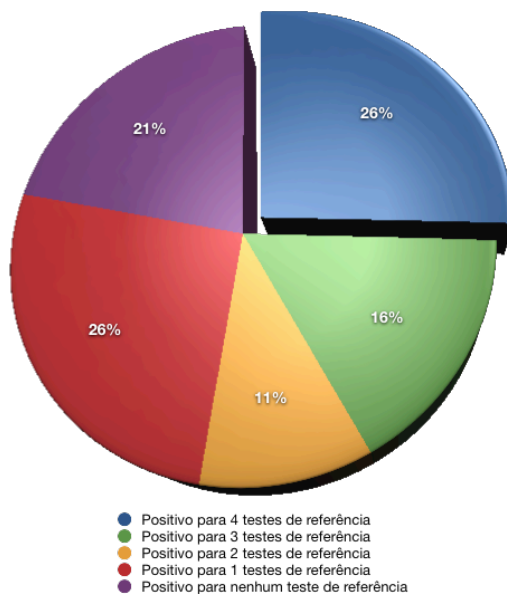
Anexo F: Correlação entre os resultados obtidos com a metodologia Au-nanossondas e quatros testes padrão na detecção de *M. tuberculosis*.

Testou-se 144 amostras biológicas com o sistema de Au-nanossondas.

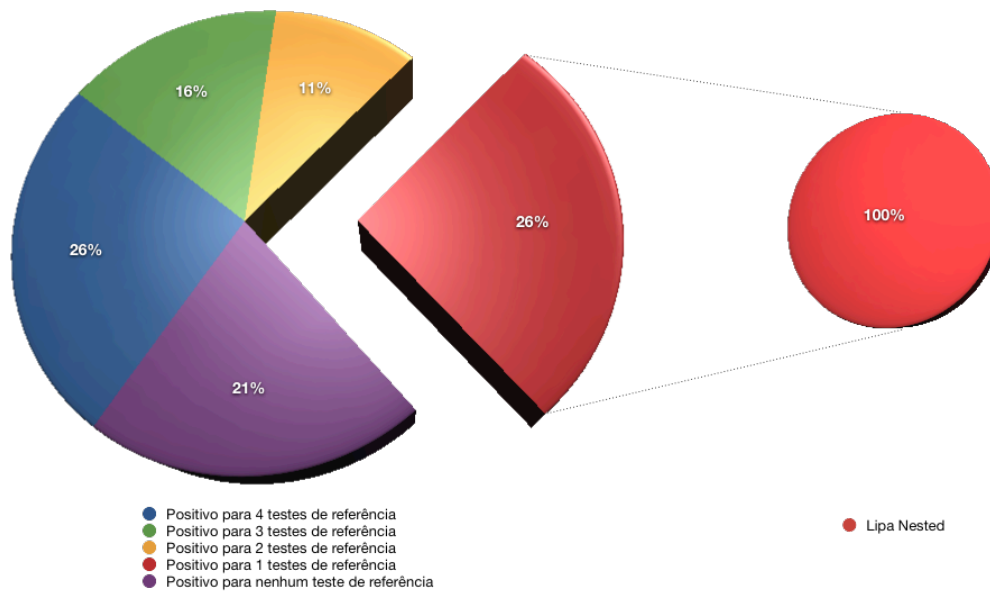
Amostras testadas	Resultados positivos	Resultados negativos	Resultados indefinidos
144	19	83	40

Efectuou-se uma análise comparando com os resultados obtidos através de quatro testes padrão.

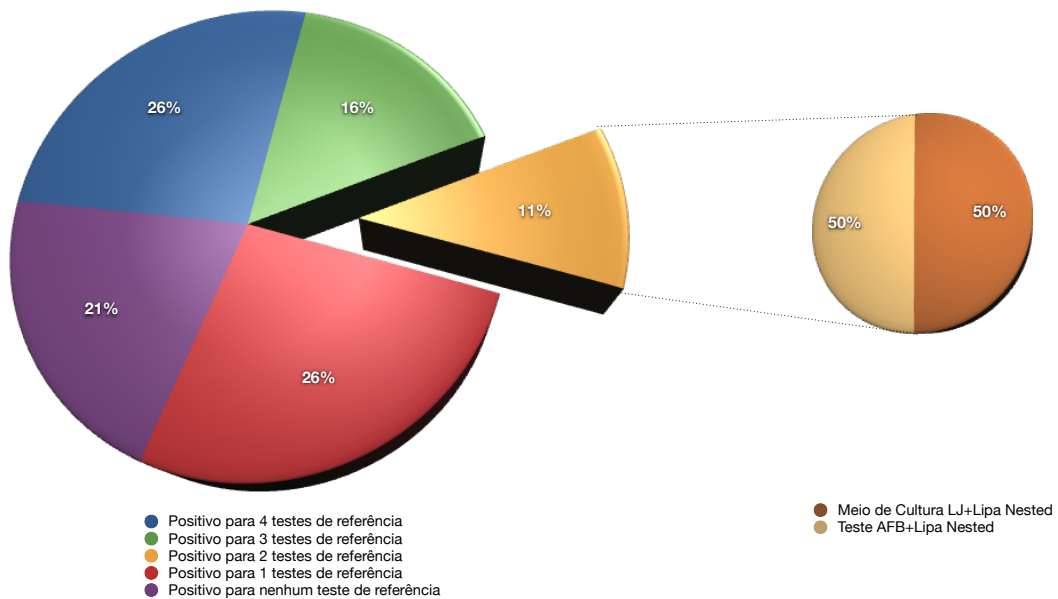
Análise dos 19 resultados Positivo obtidos pelo teste de Au-nanossondas, comparativamente com os testes de referência:



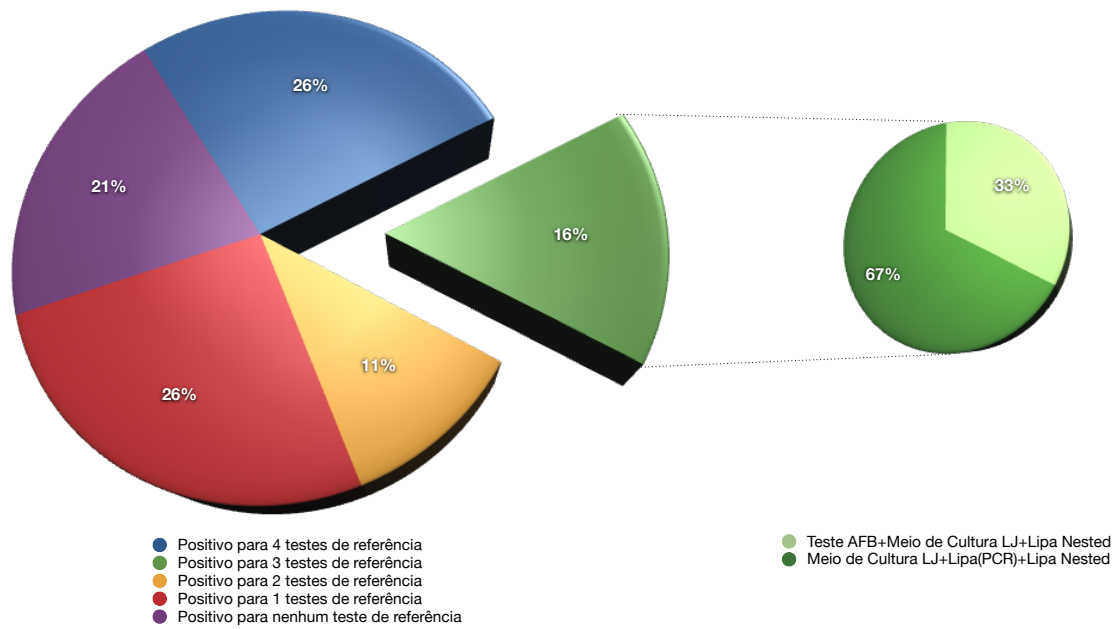
Resultados Positivo apenas para um dos testes de referência:



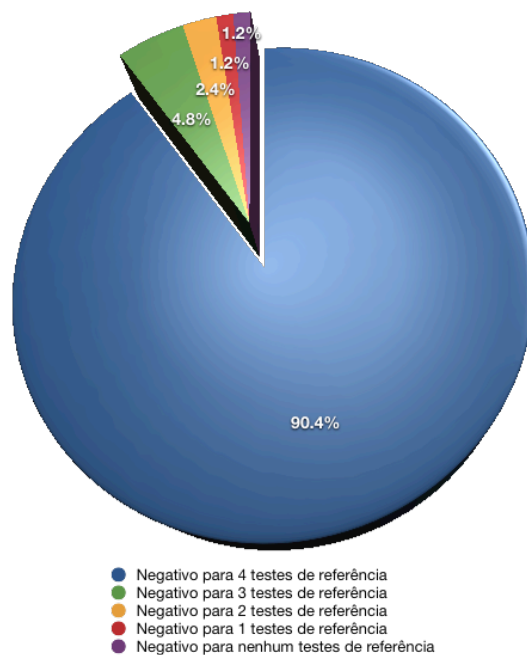
Resultados Positivo para dois testes de referência:



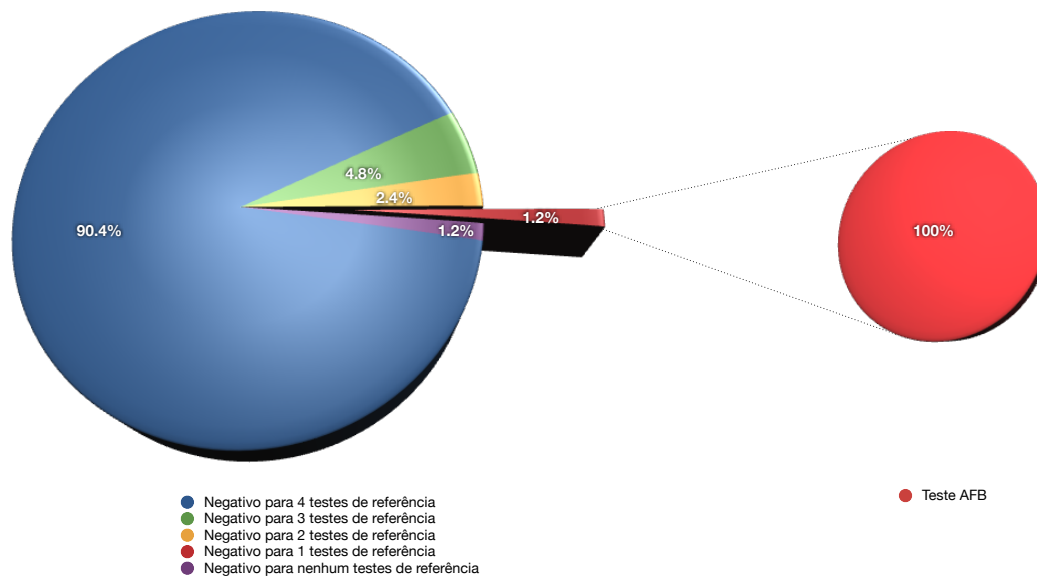
Resultados Positivo para três testes de referência:



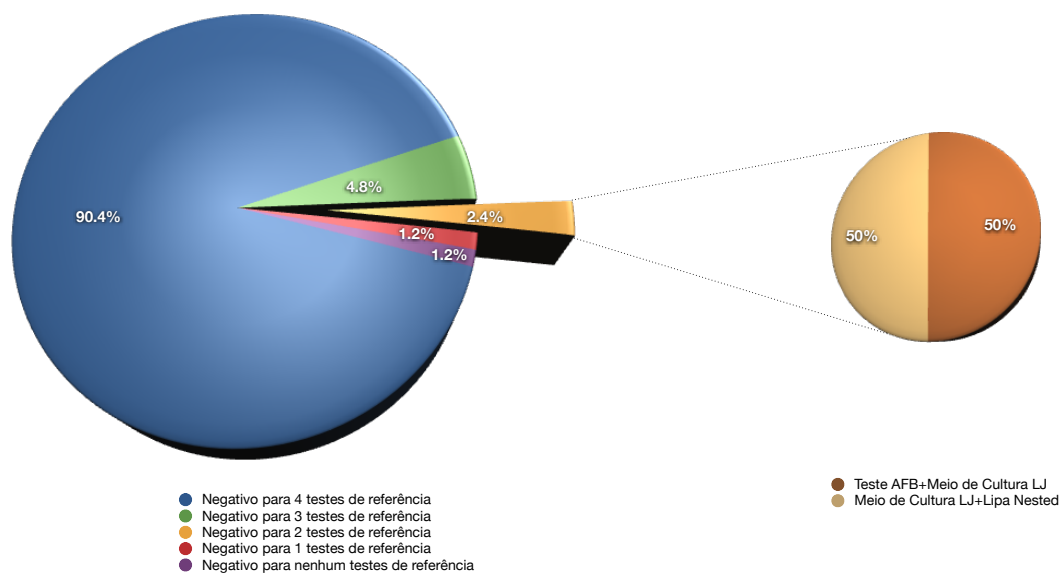
Análise dos 83 resultados Negativo obtidos pelo teste de Au-nanossondas, comparativamente com os testes de referência:



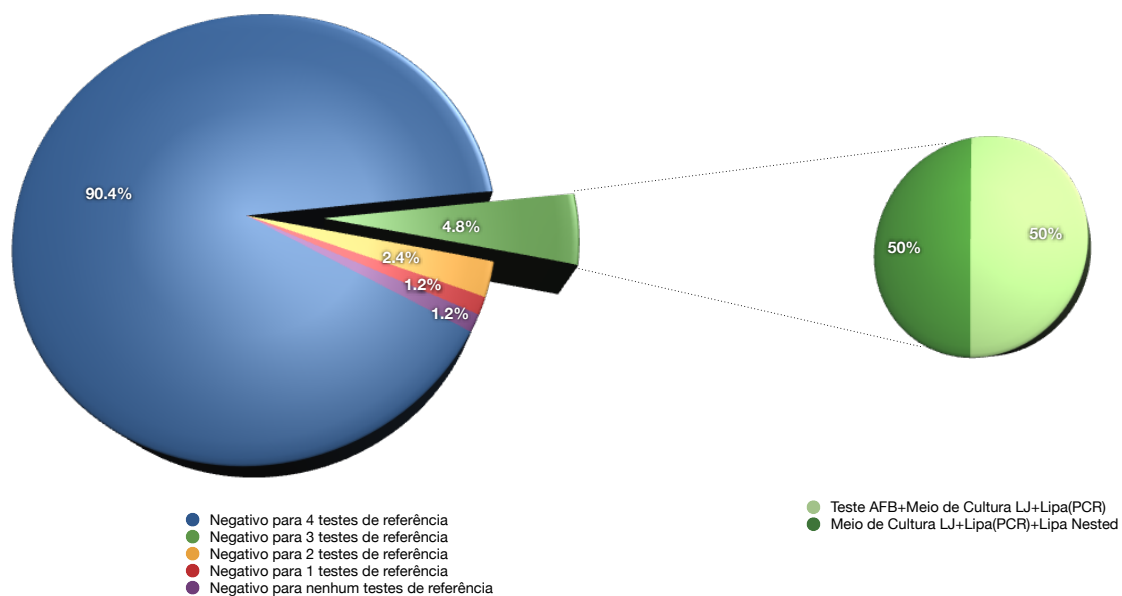
Resultados Negativo para apenas um teste de referência:



Resultados Negativo para apenas dois testes de referência:



Resultados Negativo para três testes de referência:



Análise dos 40 resultados Indefinido obtidos pelo teste de Au-nanossondas, comparativamente com os testes de referência:

